



TITLE:

大腸菌Fプラスミドの安定保持機構 (Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

小椋, 光

CITATION:

小椋, 光. 大腸菌Fプラスミドの安定保持機構. 京都大学, 1983, 理学博士

ISSUE DATE:

1983-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k2897>

RIGHT:

學位申請論文

小 椋 光

大腸菌Fプラスミドの 安定保持機構

生物物理学専攻

小 椋 光

要 旨

大腸菌染色体の複製起点を使って複製する oriC プラスミドは、安定には保持されず、細胞分裂にともなって脱落しやすいという性質を持っている。しかもコピー数がかなり高くても定性的にはやはり不安定であることがわかったので、この不安定さは、複製能の問題ではなく、分配機構をもたないためではないかと考えた。もしそうならば、安定に保持されるほかのプラスミドの分配機構を獲得することにより、oriC プラスミドを安定化することができるかもしれない。そこで ミニF プラスミド pSC-138 を oriC プラスミドに結合したところ、得られた oriC - ミニF 複合プラスミドは、ミニF プラスミドの複製が抑えられた条件下でも安定に保持されることを見出した。さらに種々の制限酵素による欠失変異の解析から、oriC プラスミドの安定化に必要な F プラスミドの DNA 領域 (sop 領域) は 約 3.0

kbの長さで、Fプラスミド自身の複製に必要な領域とは異なる領域であることがわかった。ミニFのsop領域を持つことにより安定化された

oriCプラスミドとsop領域の一部しか持たないで依然として不安定であるoriCプラスミドのコピー数

には差は認められなかった。これらの結果はsop領域は分配機構を司る領域であり、

プラスミドの分配機構は複製機構とは独立に機能することを示しているものと考えられる。

また相補性試験により、この3.0 kb DNA断片内に安定性に関与する3つの遺伝子を同定することができた。このうち2つ(sopAと

sopB)は、その遺伝子産物が安定性にとって必須であり、残りの1つ(sopC)はDNA領域

そのものが必要であることがわかった。

このようにして、ミニFプラスミドの分配機構を獲得したoriCプラスミドは安定に保持されるよう

になる。しかし、その安定性は本来のミニF
プラスミドに比べると、まだわずかながら劣る。
この点についてさらに、oriC プラスミドを使って検
討したところ、ミニFプラスミドの安定保持に関与
する機能には、分配機構のほかにさらに別の機
能があることがわかった。ミニFの分配機構に
必須な断片ともう一つの機能(ccd)を担う断
片の両方を持つ oriC プラスミドは極めて安定に
保持され、その安定性は ミニF プラスミド pSC-
138 に匹敵する。 ccd 断片を持つプラスミドの
複製が止まり、細胞分裂に伴ってコピー数が減
少し、おそらく細胞当たり1コピーになったとき、
宿主細胞分裂が阻害されることがわかった。細
胞分裂が阻害されることによりプラスミドを失った
細胞の出現はほぼ完全に抑えられる。これらの
結果は ccd 領域が宿主細胞分裂をプラスミドの
増殖に共役させるように働いていることを示唆

している。ccd断片によるoriCプラスミドの安定化は、ccd断片を持つ別のプラスミドが共存するとその効果は解除される。またccd断片を持つプラスミドの複製が止められた時に起こる細胞分裂阻害もccd断片を持つ複製可能なプラスミドの共存によって抑制される。

ccd領域(約700 bp)内には2つの機能領域があり、1つ(ccdB)は細胞分裂を阻害する働きがあり、もう1つ(ccdA)がccdBの阻害作用を抑制する働きがあることがわかった。

以上述べた2つの機能(分配機構と細胞分裂共役機構)は本来のミニFプラスミドにおいても安定保持に働いていることが確かめられた。これらの結果から、ミニFプラスミドの安定維持には複製機構、分配機構、細胞分裂共役機構の3つの機能が関与していることおよびそれぞれの機構は独立に機能している

No.

Date

ことが明らかとなった。

目 次

第1章	序論	1
第2章	材料と方法	25
I	菌株	25
II	プラスミド株	26
III	培地	26
IV	濁度の測定	27
V	プラスミド DNA の精製	27
VI	制限酵素および酵素反応	29
VII	リガーゼ反応	30
VIII	アガロースゲル電気泳動	30
IX	形質転換	31
X	プラスミドの安定性および不和合性	31
XI	プラスミドのコピー数測定	32
XII	細胞の DNA 合成の測定	33
XIII	β -ラクタマーゼ活性の測定	34
第3章	結果	35
第1節	ミニFプラスミドの分配機構	35
I	<u>oriC</u> -ミニF複合プラスミド pXX11 の作製	35
II	<u>oriC</u> -ミニF複合プラスミドの安定性	37
III	ミニFの複製に必須な領域の大部分を欠く安定な <u>oriC</u>	39
	プラスミドの作製	
IV	pXX199 由来の欠失変異プラスミドの安定性	41
V	<u>oriC</u> プラスミドの安定性に関する相補性試験	45
VI	C-A2断片による pBR322 の安定化	51
VII	A2断片を pBR322 にクローニングした時に起こる特異的欠失変異	53
VIII	C-A2断片内の不和合性遺伝子	54
第2節	プラスミドの増殖と宿主細胞分裂の共役	61
I	安定な <u>oriC</u> プラスミド pXX299 の作製	61
II	ミニFの特異的断片を持つプラスミドによる宿主細胞の増殖	63

阻害

Ⅲ	宿主細胞増殖阻害の経時的変化	65
---	----------------	----

Ⅳ	ccd断片を持つpSC101由来プラスミドが宿主増殖に及ぼす効果	68
---	----------------------------------	----

Ⅴ	ccd領域を持つ複製可能なプラスミドの共存による増殖阻害の抑制	71
---	---------------------------------	----

Ⅵ	ccd領域を持つプラスミドの共存がpXX299の安定性に及ぼす効果	74
---	-----------------------------------	----

Ⅶ	ccd領域による増殖阻害に非感受性の宿主変異株の分離	75
---	----------------------------	----

第3節	ミニFプラスミドの安定性	77
-----	--------------	----

Ⅰ	ミニFプラスミドの欠失変異株	77
---	----------------	----

Ⅱ	ミニFプラスミドの安定性	78
---	--------------	----

Ⅲ	ミニF DNA断片を持つプラスミドの共存がミニFプラスミドの安定性に及ぼす効果	80
---	---	----

第4章	考察	83
-----	----	----

第1節	分配機構	83
-----	------	----

第2節	細胞分裂英役機構	90
-----	----------	----

第3節	今後の展望	101
-----	-------	-----

謝辞	110
----	-----

参考文献	112
------	-----

表	119
---	-----

図	124
---	-----

第1章 序論

プラスミドは細胞内で染色体とは独立に自律増殖できる遺伝的単位であり、普通一定のコピー数を保ちながら安定に維持される。細菌を宿主とするプラスミドは多種多様であるが、大別すると2つのグループに分けられる(図1)。1つはColEIなどに代表されるコピー数の多いプラスミド群で、総称してrelaxed型のプラスミドと呼ばれている。これらのプラスミドDNAの分子量は小さい。もう一つのグループは大腸菌の性決定因子であるFプラスミドなどに代表されるコピー数の少ないプラスミドで、stringent型と呼ばれる。stringent型のプラスミドはrelaxed型のプラスミドに比べて分子量が大きく、重要な特徴として接合伝達能を持っている。一見、プラスミドのコピー数と分子量の間には負の相関関係が認められるのであるが、これは単に細胞中に存在できるプラスミドDNA量が、一定であるといった単純な関係ではなく、遺伝的にプラス

ミドのコピー数がそれぞれのプラスミドにおいて制御されているためであることが近年明らかとなってきた。

そのことを示す1つの例としてFプラスミドを取り上げるとFプラスミドは図2に示すように全長94.5キロベース

(以下kbと略記)にも及ぶ分子で、多くの遺伝子が機能別にクラスターを成している。このうちプラスミドが複製

し、細胞分裂に伴って安定に保持されるために必要な領域は増殖調節領域と呼ばれる領域に限定

され、他の領域はこのプラスミドが持つ別の特性、接合伝達能および宿主染色体への組み込みなどに関する領域である。したがって増殖調節領域の

みを自律増殖可能なプラスミドとして分離することができ、実際9.2kbのEcoRI f5

断片とそれ自身は複製能を持たないが適当な選択

マーカー(薬剤耐性など)を持つ断片とをDNA組換え

操作によって結合したプラスミド(いわゆるミニFプラスミド)が分離されている(4,5)。こうして分離され

ミニFプラスミドは元のFプラスミドと同様にコピー数は少なく(染色体当り1-2コピー)、安定に保持されることがわかった。つまり分子量が小さくなってもコピー数は変わらなかつたのである。このことはプラスミドのコピー数は遺伝的に制御されていることを示しており、現在ではミニFプラスミドのコピー数の調節を司る領域も複製起点の近くに同定されている。

EcoRI f7断片も自律増殖可能なプラスミドとして分離されたが、このプラスミドは非常に不安定であるし、詳細は省くが他の性質も本来のFプラスミドとは異なり、その意義は不明である。いずれにせよ f5断片は本来のFプラスミドの増殖能の特性をほとんどそのまま保持しており、コピー数を少なく保ちながら極めて安定に維持されるという点は注目値する。

Fプラスミドなどのようにコピー数の少ないプラスミドでも安定に保持されるという知見からこのようなプラス

ミドは自己複製能のみならず、娘細胞への確実な分配能を持っているだろうという考えはかなり以前より提唱されていた(6)。しかしながら、この機構についての遺伝的解析はまだあまり進んでいない。プラスミドが分配能を欠損すると不安定となり細胞分裂に伴ってプラスミドの脱落が起こるということが期待されるが(図3)、プラスミドの脱落は複製能の欠損した変異株においても見られるはずである(図3)。プラスミドが分配能を失った場合にはそれぞれのプラスミド分子が確率的に娘細胞に分配される(ランダムな分配)と仮定すれば、この場合の脱落の頻度はプラスミドが複製能を完全に失った場合の脱落頻度より低いということが期待される(図3)。しかしながら変異によってはプラスミドの複製能が完全には失われなくて部分的に欠損する可能性もあり、その場合には分配能欠損変異株と同じようにゆるやかなプラ

スミドの脱落が観察されるはずである。言い換えればゆるやかな脱落という性質(表現型)からその変異が分配能の欠損変異であるとは結論できないことになる。プラスミドのコピー数が野生型のプラスミドと同程度であるのか、つまり複製能に変化が起っていないか、あるいは変異プラスミドをもつ宿主菌とプラスミドを持たない宿主菌の増殖速度に差は認められないかといった点をそれぞれの変異株についてすべて実験的に検証して初めてそのプラスミドが分配能の欠損変異株であると言えることになる。このような方法で多くの変異株の中から分配能の変異株を同定してくることは大変な労力を要するし、しかも分配能を失ったプラスミドの分配がランダムに起こるという仮定に基づいての話である。このような理由から、プラスミドの分配機構についての研究はまだ少なく、やっと最近になっていくつかのプラスミド

において、分配機構が実際に存在することがわかりかけてきた状況である。それらの結果を簡単に紹介し、プラスミドの分配機構についての現状と問題点を探ってみることにする。

分配機構解析の1つのアプローチは複製機構の解析から発展した、いわば副産物的な方向からの解析である。先ほども述べたように複製能という表現型は分配能に比べて極めて明瞭な表現型であると言える。とにかくプラスミドとして自律増殖できるという正の選択が可能な表現型であるので F プラスミドの例でも述べたように自然界に存在するプラスミド

DNA を *in vivo* および *in vitro* の方法で小さくしてゆき、最終的にそれ以上小さくできない領域が少なくとも自己複製能の最小単位であると考えてよいだろう。

実際、多くのプラスミドにおいて、複製機構を調べる目的でミニプラスミドが分離され、自律増殖に必要な領域

が決められてきた。そしてこの領域内に複製起点があることはもちろん、プラスミドの種類によって1ないし、数個の複製に必須な遺伝子を含んでいることや、また別のプラスミド¹では複製に必須なタンパク質はすべて宿主染色体の遺伝子によって作られているものもあることなどが明らかとなってきた。ところでこのようにしてどんどんプラスミドを細小化してゆく過程で、いくつかのプラスミドでは、ある領域を欠失すると、自己複製能は依然としてあるが(複製能のあるプラスミドとして細小化してゆくのであるからこれは当然のことであるが)プラスミドの維持が不安定で、非選択的条件下ではプラスミドの脱落が起こるようになることが明らかとなってきた。最初これらの領域はプラスミドの複製に必須ではないが、複製の調節機構を司ると考えられたが、その後コピー数の制御(コピー数は複製頻度を反映すると考えられる)などには無関係にプラスミドの安定性に関係した機能

(おそらく分配機構)を司っていることがわかってきた。このような解

析によって分配機構の存在が推定され、そのおおよその

位置が決定されているプラスミドとしては RI(7)と NR1(8)

を上げることができる。なお RI と NR1 は近縁な stringent

型のプラスミドである。

別のアプローチの例として、やはり複製欠損変異の解析から

プラスミドが分配機構をもつことが示唆された例を上げること

ができる。複製に必須なプラスミド遺伝子または宿主側

の遺伝子が温度感受性となつたため低温では安定に保持され

るが、高温に移すと細胞分裂に伴ってコピー数が減少し、

ついにはプラスミドの脱落が起こる。低温でのコピー数を測

定しておき、高温に移してからプラスミドの脱落の経時的

変化を調べると、プラスミドの複製が停止した後細胞

分裂に伴ってプラスミドがどのように分配されるかを推定す

ることが可能である。その結果 *Staphylococcus* の2つのプ

スミド pRN1053 と pT169(9) および大腸菌の cloDF13(10)

と Rms 201 (11) の脱落曲線は細胞分裂時にプラスミド分子がほぼ同数ずつ娘細胞に分配されると仮定した場合の理論的な曲線に一致することが示された。また ColEI についても同様の解析がなされ、これについては同数ずつ分配されるという仮定には合わず、ランダムに分配されると解釈されたが (12)、Novick ら (9) は、これは数学的解釈に問題があり、ColEI の結果もこのモデルに合うようだと述べている。つまり例えばコピー数が細胞当り 8 コピー存在するプラスミドの場合には高温に移してプラスミドの複製が停止すると 1 世代後には細胞当り 4 コピーになり 2 世代後、3 世代後も均等に分配され細胞当り 1 コピーとなる。その後は 1 世代ごとにプラスミドをもつ細胞の割合が 50%、25% という具合に半減してゆくのである。このような分配様式は規則的分配 (regular partition) または均等分配 (equipartition) と呼ばれる。このようにプラスミドの脱落の経時的変化を数学的に解析することによって分配機構

が調べられた例は まだ少なく 規則的分配のモデルが広く
プラスミド一般に適用できるかどうかという点については今後
の解析を待たねばならないが、このモデルはプラスミドの
分配を考える上で重要な概念である。 またこのモデル
に適合するプラスミドの中に コピー数の多い いわゆる relaxed 型
のプラスミド C10DF13 や C01E1 が含まれている点は注目すべ
きである。 プラスミドの分配は複製が正常に起こるならば
少なく 1 コピーを娘細胞に分配することが保証されていれば
プラスミドの脱落は起こらず、十分に機能を果たすことになるが
ここに 述べたようなプラスミドの場合には ほぼ同数ずつ
娘細胞へ分配する機構が存在することになる。 また
コピー数の多いプラスミドの場合には特に分配機構を
持たなくても すべての分子が2つの娘細胞の片方にのみ
受け継がれるという可能性は極めて低いはずであるから、
relaxed 型のプラスミドは分配機構をもたないのではないか
という可能性も考えられてきた。 しかし上記の実験結果

は少なくとも relaxed 型のプラスミドの中にも分配機構をもつものがあることを示している。なお参考のためプラスミドのコピー数が安定保持にとってどの程度の効果をもたらすかという点についての理論的な解析の結果を表 1 に示しておく。この表はプラスミドの分配がランダムに起こる場合 (分配機構を持たない場合) にプラスミドを依然として持つ細胞の割合 (最初の値を 1 とする) が 27 世代後にはどれだけ減少するかを示している。 n の値は 1 世代当り細胞当りの平均の複製頻度であり、分裂直後のコピー数にほぼ一致すると考えてよい。プラスミドの複製調節機構についての異なる 2 つの可能性を想定して 2 つのモデルが立てられた。モデル 1 は各細胞において最初に存在するプラスミド DNA の分子数に無関係に 1 世代後に一定のコピー数 ($2n$) になるように複製が起こる場合で、モデル 2 は各細胞においてプラスミドの複製は一定の頻度で起こり、1 世代の間に n 回の複製が起こる場合である。プラスミドの複製がどちら

の様式で制御されているにせよ、コピー数 (=n 値) の増加に伴って、プラスミドの安定度が増すことが期待される。このことは極めて重要なポイントで、プラスミドの安定性を比較する際にはコピー数の異同に注意して議論をしなければ重大な誤りをおかすことにもなりかねない点を強調しておく。

さらに別のアプローチは、上に述べた規則的分配のモデルに基づいて分配能欠損株を分離する方法で Rms 201 を使って行われた (13)。プラスミドが規則的に分配されていると仮定すれば、各細胞の持つプラスミド分子の数は細胞の齢が同じであるならば、極端な差はないはずである。したがって Rms 201 の持つアンピシリン耐性遺伝子の数も細胞当りほぼ同数で同程度の耐性度を示すと期待され、実際に実験によって証明された。そこでもしプラスミドが分配能を失って細胞当りのコピー数に著しい不均衡が生じた場合には平均のコピー数は同じでも、細胞集団中にはコピー数が非常に多くてアンピシリンに対する耐性度の高い細胞が一定の

割合で存在すると期待される。このような仮定のもとに

まず高濃度のアンピシリンに耐性の変異株を分離して、

プラスミドの安定性を調べたところ、期待されるような変異株

が分離され、プラスミド上の特定の領域に欠失変異が起こ

っていることがわかった。普通この方法はコピー数の増加した

コピー変異株を分離する目的で広く用いられている方法で

あるが、この場合にはもちろん平均のコピー数は増加してお

らず、期待したようにプラスミドの安定性に関する変異株

であった。

以上述べてきた3つのアプローチは、プラスミドが分配機

構を持ち、その機構によって安定に保持されているという点

を明らかにするという目的のためには有効であったし、規則的分

配という概念をもたらしたという点も十分に評価に値する。

しかしながら、プラスミドが分配機構に関与する遺伝子を持って

いてその機能に関係した領域が欠失変異によって同定

されたということ以上の知見はない。それぞれのプラスミド

について、分配機構に関与している遺伝子はいくつあり、

それぞれの遺伝子がどのような活性をもち、細胞分裂の

際に どうやって プラスミド分子が娘細胞に分配されるのか

という問題を明らかにするためには 全く別のアプローチを考えな

ければなるまい。分配能という形質を自己複製能の場

合と同じように正の選択可能な形質として、この機能を

司る領域を単離してくることができればその目的を達成する

ことが可能である。具体的にどうすれば良いかというと、分

配機構をもたない別のプラスミドに分配機構を司ると思われる

DNA断片を結合したとき プラスミドの安定化が起こるかど

うかを調べれば良いだろう。私はこの手法を用いてミニFプラ

スミドの分配機構を調べることにした。すでに述べたように

EcoRI f_5 断片から成るミニFプラスミドは本来のFプラスミドの

増殖能の特性をよく保存している。しかも自己増殖能

に必須な領域はこの9.2 kb断片のほぼ中央約2.5 kb領

域内であることがわかっており(14)(図4) この領域内に

複製起点 および複製に必須な遺伝子やコピー数の調

節を司る領域などが同定されている(14,16-27)。しかし、こ

の領域以外の大部分を欠失したミニプラスミドを分離すると

すでに述べた RI や NRI の場合と同様に、プラスミドの維持

が不安定となることがわかり、種々の欠失変異の結果から図4

に示した A₂ 断片が分配機構を司るのではないかと推定さ

れた(18,27)。そこで私は、この領域が真に分配機構を担

っているか否かを上に述べたような手法で検証することを試みた。

この目的のためには分配機構を持たない別のプラスミドが必

要である。大腸菌染色体の複製起点 (oriC) を使って複

製するプラスミド (いわゆる oriC プラスミド) は ミニ F プラスミドの

ように安定には保持されず、脱落しやすいという性質を持っ

ている(28-31)。この性質は独立に分離された oriC プラス

ミドについても共通にみられ、しかもコピー数がかかなり高く

も定性的にはやはり不安定であることがわかったので(32)、

この不安定性は複製能の問題ではなく、分配機構をもた

ないためではないかと考えた。もしそうしたならば、安定に保持

されるミニFプラスミドが持っていると思われる分配機構を司る

ミニFのDNA断片を oriC プラスミドに結合することにより oriC

プラスミドを安定化することができるとも思われる。そこで

(oriC-ミニF複合プラスミドは、ミニFプラスミドの
ミニFプラスミドを oriC プラスミドに結合したところ、得られた

(複製が抑えられた条件下)

でも安定に保持されることを見出した(33)。さらに種々の制

限酵素による欠失変異の解析から、oriC プラスミドの安定化

に必要な F プラスミドの DNA 領域は先ほど述べた A2 断片

の大部分とその左側の C 断片にまたがる約 3 kb の領域で

(図4)、ミニFプラスミド自身の複製に必要な領域とは異なる

領域であることがわかった(15)。このことはミニFプラスミドの分配

機構が複製機構とは独立に機能することを示している。

また相補性試験により、この 3 kb DNA 断片内に安定性に関

与する 3 つの機能領域を同定することができた(15)。この

うち 2 つは、その遺伝子産物が安定性にとって必須であり、

残りの 1 つは DNA 領域そのものが必要であることがわかった。

同様の解析法によって分配機構を司る領域を同定できた

例はこれまでわずかに pSC101 が知られているだけである(34)。

しかし、pSC101 の分配機構を司る領域はいくつかの点にお

いて ミニ F プラスミドの分配機構を司る領域とは異なる性

質をもつことがわかった(詳細は後で議論する)。今

後このような解析法によって他のプラスミドの分配機構

を司る領域の分離同定およびその領域内の遺伝子解

析が進めば、プラスミド間での分配機構の類似点や相異点

が明らかとなるに違いない。また、遺伝子が同定され

たことにより、より詳細な遺伝的解析が可能になったば

かりかその産物の同定精製も可能で分配機構の素反応につ

いては生化学的解析も可能な状況になってきた。

一方、もう一つの主題であるプラスミドの増殖と細胞周

期との関係は複製調節機構に関する重要なテーマ

として多くの研究者によって数多くの知見が得られた

にもかかわらず、その本質についてはよくわかっていない。

プラスミド、特に F プラスミドなどのようにコピー数の少ない stringent

型のプラスミドの複製制御を研究する一つの大きな意義は、

これらのコピー数が少なく、しかも安定に維持されるというまさに

宿主染色体の持つ特性を備えているため、染色体複製のモ

デル系となりうるのではないかという点であろう。大腸菌染色体
(より、Helmstetterらのモデル(35)によると、細胞周期と複製周期との共役、
の複製周期は細胞増殖と密接に共役しては複製開始の時期決

定によって一義的に決まり、培養液の違いにより細胞の増殖

速度が変化しても、温度が一定なら DNA 鎖の伸長反応の速

度は一定であるという。したがって複製開始の分子機構

を解析することが特に重要で、その目的のためにすでに述

べた oriC プラスミドが分離されてきたのである。そのような

観点からいくつかの stringent 型のプラスミドの複製について

も細胞増殖との間に何らかの共役機構があるのではないか

と考えられ、それを検証する研究が行われた。初期には

共役現象を示唆するような結果がいくつか報告されたが(36-38)

同調法などの操作に問題が多く、最近の解析(39-47)ではこ

これらの結果はすべて否定的で、プラスミドの複製は細胞周期
または染色体複製とは何ら共役しておらず、いずれの時期
においても起こりうるという考えが現在のところ最も確かな概
念として受け入れられている。 - しかも大腸菌染色体の複
製起点を使って複製を開始する oriC プラスミドにおいて
も共役現象は認められなかった (48)。このことからすぐ
に自然界に存在するすべてのプラスミドおよび人工的にプラスミ
ド化したレプリコンは細胞分裂周期との共役機構を持たないとい
うふうに一般化ができるとは言えないが、少なくともプラスミ
ドの複製制御は染色体の複製制御とは質的に異なると
考えてよさそうである。

このようにプラスミドの複製は細胞周期の特定の時期に
起こるようには調節されていないことが明らかとなってきたが
一方では、プラスミドの増殖・維持が細胞分裂と何らかの関
係を持つことを示唆するいくつかの別の観点からの解
析結果も報告されている。プラスミドの複製または維

持機構が何らかの阻害を受けた時に宿主菌の増殖が同時に阻害されるという現象がそれである(49-53)。しかしこれらの変異株の解析はいまだ不十分で少なくとも *Rts1* の場合には複製が温度感受性であることが宿主菌の増殖が高温で阻害されることの直接の原因ではなく、宿主菌の増殖阻害に関する領域は複製領域の外側にあることが示されている(54)。Fプラスミドの *letA* 変異は複製領域のすぐ近くに位置するが、複製に必要な領域内に起こった変異ではないことが明らかとなっている(55)。

mafA^{ts} 変異株(52)はFプラスミドおよびその近縁種のプラスミドが高温で特異的に阻害される変異株として分離同定され、Fプラスミドの複製阻害にともなう宿主菌の増殖阻害が観察されている。また *ColVBtrp* プラスミド上の変異により、プラスミドの維持と同時に宿主菌の増殖阻害が起こる場合があることが報告されている(51)。上に述べたような宿主菌の増殖阻害がプラスミドの複製維持機構に直

接関係した変異によって引き起こされているか否かにつ

いての結論は不明であるのでここでは議論しない。

しかし、いずれにせよこのような変異株が分離されるということは

プラスミド上に宿主細胞分裂に何らかの影響を及ぼしうる遺伝

子またはDNA領域が存在することを示唆する事実として注目す

べきである。

以上述べてきたようなプラスミドの増殖と細胞分裂周期との相

互作用の可能性をふまえて、私は次のようなアプローチを行った。

すでに述べたように oriC プラスミドが MiniF プラスミドの分配機構を

獲得すると安定に保持されるようになる。しかし厳密には

その安定性は本来の MiniF プラスミドとまったく同じではなく、わずか

ではあるが、有意に

—— プラスミドの脱落が認

められた。その説明としては2つの可能性が考えられた。1つは

MiniF プラスミドの分配機構の働きが oriC プラスミドに結合したときに

は本来の MiniF プラスミド上にある場合ほど十分でないという可能

性である。 もう1つは、ミニFプラスミドの安定保持には分配

機構の他にさらに別の機能が働いているという可能性である。

前者の可能性を実験的に検証することは容易ではないが、

もし後者の可能性が正しいなら、安定保持に働く別の機能

を司る領域はミニFの複製および分配機構を司る領域の外にあると

考えられるので、図4に示した複製領域より左側の領域のどこかに

あると推定される。そこでこの領域を含むDNA断片をミニFの分配

機構により安定化された oriC プラスミドに結合し、そのプラスミド

の安定性を調べた。すると予想したように、oriC プラスミドは

極めて安定に保持されるようになった(56) では新たに結合したミニ

F DNA断片内にはどのような機構が担われているのだろうか？

先ほど述べた細胞分裂に影響を与える letA 変異はちょうど

この領域内に位置していることがわかっていたので(57,58)。この断

片は細胞分裂機構との相互作用によってプラスミドを安定に保持

するよう働いているのではないかと仮定した。前に述べたように

プラスミドの複製の時期は細胞分裂周期とは直接共役して

いないことが示されているが、もしプラスミドの複製がまったく

細胞周期の任意の時期に起こるのであれば、細胞中のプラス

ミドは分裂直後に複製することもあるだろうし、次の分裂の

直前に複製することもあるだろう(図5)。この考えに基づくと、

細胞集団中には分裂直前になってもまだプラスミドの複製が起

こらず、プラスミド分子が1コピーしか存在しない細胞がある

頻度で含まれていることになる。この細胞がそのまま分裂すれ

ばいかにプラスミドが分配機構をもっていても当然娘細胞のうち

片方はプラスミドを受け取ることはできない。つまりプラスミドの脱落

が起こるはずである。にもかかわらず通常ミニFプラスミドを失

った細胞の出現はめったに検出されない。したがって細

胞が分裂直前になってもミニFプラスミドの複製が完了してい

ないという状況が生じた時には何らかの働きで細胞の分裂が

一時的に止められるのかもしれない。そこで分配機構を司る

領域に加えて oriC プラスミドの完全な安定化に必要なもう一つ

の領域がその働きを担っているのではないかと考えた。このこと

を検証するためこの領域を別のプラスミドに結合し、そのプラスミド

の複製が阻害される条件下で宿主細胞増殖を調べると、細胞

分裂が著しく阻害され、フィラメント状の細胞が形成されることが

わかった(56)。しかも経時的変化を調べた実験結果から、細胞

分裂の阻害は、この領域を持つプラスミドのコピー数が減少

し、おそらく細胞当り1分子になった時にのみ起こることが推

定された。このことは^a「プラスミドの増殖が宿主の細胞分裂に共

役する」のではなく、逆に「プラスミドの増殖に宿主の細胞分裂が共

役させられている」ということを意味している。以上述べてきた

ようなアプローチによりプラスミドの安定保持に関与することが明らかと

なったミニFプラスミドの2つの機能、分配機構および細胞分裂

共役機構についての解析結果(15,33,56,59)について報告し、

考察する。

第2章 材料と方法

I 菌株

使用した菌株はすべて大腸菌 K-12 株由来であり、表2に示した。

表2 使用した大腸菌株

Strain	Sex	Relevant genotype	Source (reference)
KY7231	F ⁻	<u>trpB9578</u> <u>tna-2</u> <u>rpsL</u> <u>recA1</u>	T. Miki (60)
KY7341	Hfr	<u>trpB9578</u> <u>tna-2</u> <u>rpsL</u> <u>recA1</u>	T. Miki (60)
KY9524	F ⁻	<u>ilv</u> <u>pro</u> <u>arg</u> <u>del(trp-tonB)</u> <u>leu</u> <u>lacY</u> <u>tna</u> <u>tsx</u> <u>pea</u> <u>rpsL</u> <u>recA1</u> <u>supE</u> <u>mafA1</u>	C. Wada (61)
KZ200	F ⁻	<u>ilv</u> <u>thr</u> <u>metE</u> <u>trp</u> <u>tyr</u> <u>thy</u> <u>rpsL</u> <u>recA1</u>	M. Tanaka (unpublished)
km1213	F ⁻	<u>polA^{ts}</u> <u>his</u> <u>argG</u> <u>metB</u> <u>leu</u> <u>rpsL</u> <u>xyl</u> <u>lacY</u> <u>thy</u>	H. Tsutsui & Matsubara (62)
MM383	F ⁻	<u>polA12</u> <u>thy</u> <u>rha</u> <u>lac</u> <u>rpsL</u>	M. Monk & J. Kinross (63)
KH802	F ⁻	<u>met</u> <u>gal</u> <u>supE</u> <u>hsdR</u>	W. B. Wood (64)

遺伝子記号は Bachmann & Low (65) に従った。

Ⅱ プラスミド株

使用したプラスミドのうち、pMCR115(29)、pSC138(4)、pBR322(66)、pHSG415(67)については記載されている。pKP1033(ミ-F-pBR322複合プラスミド)は九州大学の三木健良博士より、pNH05(oriC-Ap^rプラスミド)は広瀬進博士よりいただいた。その他のプラスミドは本研究のために作製した。

Ⅲ 培地

使用した培地の組成は次の通りである。

1. L 培地 (pH 7.0) (68)

1% バフト・トリプトン (Difco 社)

0.5% イースト エキストラクト (Difco 社)

0.5% NaCl

0.1% グルコース

固形培地は 1% の寒天を含む。必要に応

いて $25 \mu\text{g/ml}$ の 4 ミンを補った。抗生物質は次の濃度で加えた；アンピシリン $20 \mu\text{g/ml}$ ；テトラサイクリン $15 \mu\text{g/ml}$ ；フロラム フェニコール $20 \mu\text{g/ml}$ 。

2. メディウム E' (69) (以下 ME 培地と略記)

0.5% の グルコース を補い 合成培地として使用した。必要に応じて $50 \mu\text{g/ml}$ の アミノ酸 および 0.2% の カザミノ酸 (Difco 社) を補った。

IV 濁度の測定

培養液の濁度は No. 54 の フィルターを使用して、フレット=サマーソン光電比色計にて測定した。

V. プラスミド DNA の精製

プラスミド DNA の精製は Meyers ら (70) および Clewell & Helinski (71) の方法に従って透明溶液液を調製し、これを CsCl -エチジウムブロミド平

平衡超遠心にかけ、プラスミドCCC-DNA分画を分離して行った。この方法によって精製したプラスミドDNAは純度が高く、本研究で行ったすべての実験に適している。目的に応じて簡便法も用いた。ColEI型のプラスミドの精製には Kleinら(72)の方法も用いた。この方法によって精製したプラスミドDNAは制限酵素による切断実験に適しており、T4DNAリガーゼによる閉環反応も少し効率は悪いかも可能であった。コピー数の少ないプラスミド(おもにミニFプラスミド)の精製には Ishn-Horowitz & Burke(73)の方法も用いた。この方法では染色体DNA断片の混入が少なく、平衡超遠心を行わなくても制限酵素による構造解析が可能である。ただしT4DNAリガーゼによる閉環反応には不適であった。

VI. 制限酵素 および 酵素反応

制限酵素 AccI, BamHI, BglII, EcoRI, HaeII, HincII,

HindIII, HpaI, KpnI, PstI, SalI, SmaI および XhoI は 宝

酒造 の もの を, AvaII, DdeI, PvuI, PvuII, RsaI および

XmaI は New England Biolabs 社 の もの を, そして PstI

については Boehringer Mannheim 社 の もの も 使用した。

なお SmaI と XmaI の 認識塩基配列は 同い で SmaI

による切断では 末端は blunt end になり, XmaI では

cohesive end を 生じる。これらの酵素は 目的に 応じ

て 使い分けたが、混乱を さけるため、これらの酵素

による切断点は 本論文では XmaI 切断点として

記載している。制限酵素の反応は 20mM トリス塩

酸緩衝液 (pH 7.6), 20mM $MgCl_2$, 5mM ジ4オス

ライトール, 50mM NaCl および 500 $\mu g/ml$ の血清ア

ルブミンを含む反応液で 37℃ に 保温して 行った。

KpnI に よる切断の場合には NaCl を 含まない反応液

を用いた。また SmaI の反応液の トリス塩酸緩衝液は pH8.0 のものを使用した。

VII リガーゼ反応

リガーゼ反応は、1単位の T4 DNA リガーゼ (宝酒造) を使って 66mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.6)、6.6mM $MgCl_2$ 、10mM ジチオスライトール および 500 μ M ATP を含む反応液 (25-100 μ l) で、DNA 濃度を 10-200 μ g/ml とし、17 $^{\circ}$ C で 3時間 または 4 $^{\circ}$ C で 一夜保温して行った。

VIII アガロースゲル電気泳動

アガロースゲル電気泳動は 和光純薬 または Sigma 社の アガロースを用い、平板ゲルで行った。ゲルの濃度は 目的に応じて 0.7-1.8% とし、泳動緩衝液は 50mM トリスほう酸緩衝液 (pH8.3)、1mM Na_2EDTA

を使用した。

IX 形質転換

プラスミドDNAによる形質転換は Cameron ら (74) の方法に従って行った。培地は L 培地を用いた。

X. プラスミドの安定性 および 不和合性

プラスミドを持つ菌株をアンピシリンを含む選択 L 培地で 37℃ 一夜振とう培養し、非選択 L 培地で 500 倍から 1000 倍に希釈し 37℃ で培養を続ける。経時的に新鮮な非選択 L 培地で適当に希釈し、

実験中常に対数増殖期に保った。培養液 0.1 ml

を取り出し 適当な希釈を行って非選択 L 寒天培

地に塗抹し 37℃ で一夜培養した。少なくとも 200 の

集落について 20 μ g/ml のアンピシリンを含む選択培

地に楊枝で塗って 37℃ 一夜培養しアンピシリン耐性

集落の割合を調べた。

2種のプラスミド間の不適合性は同様の方法で調べた。アンピシリン耐性プラスミドとテトラサイクリン耐性のプラスミドを同時にもつ株をアンピシリンとテトラサイクリンを含む選択培地で培養し、上に述べたようにして非選択培地で培養を続けた。2つのプラスミドのうち片方が脱落した細胞の割合はそれぞれの薬剤を含む培地で上に述べた方法で調べた。

XT プラスミドのコピー数測定

プラスミドのコピー数は Womble ら (75) の方法に従って、
パルス = チェイスの標識によって測定した。37℃で対数増殖期の培養液 2ml に $[^3\text{H}]$ 4ミジン (26.4 Ci/mmole) を最終濃度が $25 \mu\text{Ci/ml}$ となるように加え、37℃ 5-20分間パルス標識を行ったのち 1 mg/ml の 4ミジン E 0.2 ml 加えて 10分間保温した。集菌後 リゾチーム / EDTA /

SDSで溶菌し、CsCl-エチウムブロミド平衡密度勾配

遠心した。遠心後分画し、放射活性を測定した。

コピー数はプラスミドDNA分画と染色体DNA分画の放

射活性、およびプラスミドの分子量と染色体の分子量

$[2.8 \times 10^3 \text{ X ガタリトン (Mdal)} = 4.2 \times 10^3 \text{ キロベース}$

(kb)] から計算した。不安定なプラスミドの場合

にはプラスミドを失っている細胞についての補正を

行った(33)。

XII 細胞のDNA合成の測定

DNA合成は $1 \mu\text{Ci/ml}$ の $[^{14}\text{C}]$ 4ミン(54.5 mCi/mmol)

を含む培地で菌を培養し、経時的に培養液

を取り出して、酸不溶分画への取り込み量で測定

した。

XIII. β -ラクトマーゼ活性の測定

β -ラクトマーゼの活性は O'Callaghan ら (76) の方法に従
って、セファロスポリン系色素ニトロセフィン (compound 87/312
Glaxo - Allenburys Res.) を用いて測定した。

第3章 結果

第1節 ミニFプラスミドの分配機構(15, 33)

I oriC-ミニF複合プラスミド pXX11の作製(33)

oriC プラスミドは 非選択的条件下では 安定に保持されないが

これは oriC プラスミドが 分配機構を持たないためではないかと

考えた。 もしそうならば、安定に保持される ミニFプラスミド

pSC138(4)は 分配機構を持っていると思われるので、これを

oriC プラスミドに 結合すれば、得られる複合プラスミドは 安定に

保持されるであろう。 ミニFプラスミドの複製は Hfr株で 阻害

されることがわかっているので(20)、分配機構が 複製機構とは

独立に働くならば、oriC-ミニF複合プラスミドは Hfr株の

中でも 安定に保持されるかもしれない。 このようは仮説に基づいて

pSC138を oriC プラスミド pMCR115(29)に 結合した。

pSC138は 選択マーカーとして アンピシリン耐性遺伝子(bla)

を持っているので pMCR115と pSC138の DNAを EcoRIで

切断後、T4 DNAリガーゼで 閉環し、このDNA溶液を用いて

アンピシリン感受性の Hfr recA1 株(CKY7341)を形質転換し

アンピシリン耐性の形質転換体を得た。この条件下では、少なくとも

oriC プラスミド pMCR115 と アンピシリン耐性遺伝子を含む

断片の結合した プラスミドが 選択される。そこで次に得られた

アンピシリン耐性の形質転換体から プラスミド DNA を精製し、

制限酵素による解析を行ったところ、pMCR115 と アンピシリン

耐性断片に加えて ミニ F DNA 断片の結合した複合プラスミドが

1 つ分離されていた。このプラスミドを pXX11 と名付けた(図6)。

なお recA1 株を宿主として用いたのは oriC プラスミドが

DNA の相同性によって宿主染色体に組み込まれるのを避けるため

である。oriC プラスミドを用いた以下に述べるすべての実験に

において 宿主は recA1 株を用いた。

pXX11 は F プラスミドの複製を阻害する宿主変異株

mafA1 recA1 (KY9524) (61) においても複製可能であった。

したがって このプラスミドは Hfr 株や mafA1 株においては

oriC を使って複製していると思われる。

II oriC - ミニF複合プラスミドの安定性

oriC - ミニF複合プラスミド pXX11 が予想したように ミニFを
持たない oriC プラスミドに比べて安定に保持されるかどうかを
調べるため アーピシリンを含まない非選択培地で菌を増殖させ
アーピシリン耐性菌(プラスミドを持つ菌)の割合を経時的に
調べた。

図7に示すように対照として用いたミニF DNA を持たない
oriC プラスミド pNH05 (図8) (77) は すでに報告されている
oriC プラスミド (28-31) と同様に 菌の増殖に伴って速かに
脱落し プラスミドを失った細胞が高頻度で出現してくる。これに
対して oriC - ミニF複合プラスミド pXX11 はゆるやかに脱落は
するものの pNH05 に比べて明らかに安定である。さらに pXX11
由来のコピー変異株 pXX11-S2 および pXX11-S21 (33) は
さらに安定で プラスミドを失った細胞はわずかに出現してはいない。

プラスミドが分配機構を持たないで 全くランダムに娘細胞に
入っていく場合でも プラスミドのコピー数が多い場合は プラスミドを

失った細胞が出現する確率は低い(7)(表1)。したがって
上に述べた oriC-ミニF 複合プラスミドの安定保持がコピー数の
増加によるのではないことを調べるため プラスミドのコピー数を
測定した。表3 に示すように pXX11のコピー数は 染色体
当り約0.9で pNH05はそれよりやや高い値を示した。

pNH05を持つ菌の集団中には プラスミドを失った細胞が
高頻度に出現している。そのコピー数の値そのものは 正確で
あるとはいえないが、少なくとも pXX11と同等か やや高いと
いう点は 確かなように思われる。したがって pXX11が pNH05より
安定に保持されるのは コピー数の効果によるのではなく 結合した
ミニF DNA上に プラスミドの分配を司る領域があることを示唆
している。逆に ミニF DNAを持たない oriC プラスミドが不安定で
あるのは 宿主染色体の oriC と プラスミド上の oriC との間で
複製開始に必要なタンパク質(例えば dnaA タンパク質など)
の奪い合いが起こるといったことではなく、分離された oriC
プラスミドが 分配機構を持たないためであろうと思われる。

コピー変異プラスミド pXX11-S2 および pXX11-S21が

pXX11 より 2.5 倍に 安定に 保持されるのは、これらのプラスミドの

コピー数が pXX11 より 約 3 倍高いことによるものと考えられる。

pXX11 と mafA 変異株に入れて 安定性を調べたところ

Hfr 株より 2.5 倍に 安定に 保持され、プラスミドを失った細胞は、

実験的には 検出されなかった。 mafA 株においては コピー数が

Hfr 株に 比べて 約 2.5 倍高い値を示したので コピー数の増加に

よる効果も その原因のひとつと考えられるが、Hfr 株における コピー

変異プラスミド pXX11-S2 および pXX11-S21 は pXX11 より

約 3 倍高い コピー数を示すにもかかわらず、低頻度ながら プラスミド

を失った細胞が 検出されるので、コピー数の他にも原因があると

思われる。これについては 後で 考察する。

Ⅲ ミニ F の複製に 必須な領域の大部分を 失くす安定性

oriC プラスミドの作製 (15)

すでに述べたように Hfr 株においては、ミニ F の複製起点からの複製は

阻害されるので、oriC プラスミドの安定化に働くミニFの機能は、

複製能とは異なると考えられるが、このことをさらに確かめるには、

安定化に必要な領域がミニFの複製に必要な領域とは異なる

領域であることを示すことが必要である。また oriC プラスミドの

安定化に必要な機能の中にはミニFゲノムの遺伝子産物が含ま

れている可能性も考えられるが、その場合宿主として Hfr 株を

用いれば、染色体に組み込まれた Fゲノムの遺伝子から作られた

産物が働くかも知れないので安定化に必要な F プラスミド由来の

すべての遺伝子と同定するには宿主として F⁻株を用いることが

必要である。以上の理由からミニFの複製に必要な領域を

欠いて、F⁻株において安定に保持される oriC プラスミドを

分離することを試みた。図9に示す oriC プラスミド pXX199は

pXX11 とは別の oriC - ミニF 複合プラスミド pMCF1(60)

から2回の試験管内組換え操作によって作製したプラスミドで、

ミニF由来の DNA断片として D, C および AZ断片(断片の

名称は Murotsu's(14)による)を持つが自律増殖に

必須な B 断片を欠失している。このプラスミドは F⁻recA1 株

(KY7231) に入れた場合 非選択培地での 増殖中安定に

保持される (結果は後で示す)。このことは oriC プラスミド

の安定保持には B 断片が必要でないことを示している。なお

ミニ F プラスミド由来の断片の名称および ミニ F DNA 上の位置は

以後図 9 に従って表わす。

IV. pXX199 由来の欠失変異プラスミドの安定性

oriC プラスミドの安定化に必要な最小領域を決定するため

種々の方法で pXX199 の欠失変異株を分離し、これらのプラスミドの

F⁻recA1 株における安定性を調べた。

制限酵素 Pst I を用いて 2 つの欠失変異を得た。pXX258 は

D 断片を欠いており pXX206 は D および C 断片を欠き A2 断片

のみを持つ (図 10)。また pXX258 の Sal I 断片を欠失させて

pXX292 を得た。同様に 図 10 に示す他のプラスミドの多くは

適当な制限酵素を用いて得た欠失変異株である; pXX279 と

pXX271は Hae II を用いて pXX250は Kpn I を用いて

そして pXX253は Pvu II を用いて作製した。残り4つの

プラスミド pXX226, pXX224, pXX233 および pXX281は

A2断片の中に自然欠失変異を持っている。この種の欠失は

A2断片のみをコピー数の多いベクタープラスミド pBR322上に

クローニングした時に得られた(詳細は後述)。pXX226,

pXX224 および pXX230は pXX199の EcoRI-PstI

断片(アンピシリン耐性遺伝子から oriC を含む領域)と

図10に示した長さの欠失変異を持つA2断片をそれぞれ結合

して得た。pXX281は2回の試験管内組換えを行って得た。

上に述べたすべての pXX199由来の oriC プラスミドは

アンピシリン耐性遺伝子を持っているので、それぞれのプラスミドを

持つ F⁻recA1 株の対数増殖期における全生菌数に対する

アンピシリン耐性菌の割合を求めることにより、プラスミドの安定性を

調べた。結果を図10の右欄と図11に示す。pXX199と

同様に安定に保持されたのは、pXX258, pXX272 および pXX279

の 37 の プラスミドであった (ただし 図 11 には pXX199 の結果のみを示した)。残りの プラスミドはすべて安定には保持

される (pXX250, pXX226 および pXX224 の結果は 図 11 に示していない)。プラスミドの脱落の程度は pXX271 を除いて

ほぼ同じであった。pXX271 は安定な oriC プラスミドのグループと不安定なグループの中間的な安定性を示した。

Hfr 株を用いた解析の時点でも述べたように分配機構を

持たない プラスミドでも コピー数が高いと比較的安定に

保持されることがあるので、ここに得られた oriC プラスミドに対しても

コピー数を測定した。表 4 に示すように oriC プラスミドは

ミニF プラスミド pSC138 より 3 倍位高いコピー数の値を示すが

安定な oriC プラスミド pXX199 と pXX279 のコピー数は、

不安定な oriC プラスミド pXX206 と pXX233 のコピー数とほぼ同じで

有意な差は認められない。一方 中間的な安定性を示す pXX271

のコピー数は pSC138 の約 6 倍で他の oriC プラスミドより

2 倍程高い値を示した。図 10 に示す他の oriC プラスミドのコピー数

については 正確に 測定しなかったが 透明溶菌液の CCC

プラスミド DNA の 量 を アガロースゲル電気泳動で 解析したところ、

pXX271 以外は 同程度であったし、アニピツリニ耐性遺伝子産物の

β -ラクタマーゼの 活性も同様であった。したがって これらの oriC

プラスミドの コピー数 は ほぼ同じであると 考えられる。つまり ミニF

断片による oriC プラスミドの 安定化は プラスミドのコピー数の

調節とは 無関係であると 考えられる。さらに pXX271 は 定性的

には 不安定であるが、コピー数の増加によって いく分安定化され

中間的 安定性 を示すものと 考えられる。

安定に 保持される oriC プラスミドは すべて共通して ミニFの

Hae II - Sal I (46.4 - 49.4 kb) 断片を持っていることから

安定化に必要な プラスミドの機能は すべて この断片が担っていると

結論される。おそらく その機能は プラスミド分子の 娘細胞への

分配機構であろう。

V oriC プラスミドの安定性に関する相補性試験

3.0 kb の Hae II - Sal I (46.4 - 49.4 kb) 断片中に

存在する遺伝子の機能を解析するため、MiniF の C-A2 断片の

種々の領域を pBR 322 に結合し、これらのプラスミドを oriC
(oriC プラスミドの安定性に対する)

プラスミドと共存させ、効果を調べることにした。二種の実験

に用いた pBR 322 由来のプラスミドの構造を図12に示す。

pXX 167 は pBR 322 - MiniF (f5) 複合プラスミド pKP 1033

(このプラスミドの構造は後で図17に示す) を Pst I で切断して

作製した。pXX 288 は pXX 167 の A2 断片中の Hinc II

断片を欠失させて作った。また pXX 300 は pKP 1033 を Pvu I で

切断して作った。残り2つのプラスミド pXX 254 と pXX 255 は

pXX 167 の持つ C 断片を pBR 322 の Pst I 部位に挿入して得た。

pXX 254 と pXX 255 では挿入された C 断片の向きが互いに逆で

ある。これらの pBR 322 由来のプラスミドはすべて選択マーカー

としてテトラサイクリン耐性遺伝子を持つが、アピシリン耐性遺伝子

は持たない。一方 oriC プラスミドはすでに述べたように

アンピシリン耐性遺伝子の45を持つので oriC プラスミドとこれらの
プラスミドが共存した株は容易に選抜できる。

始めに、C断片を含む pBR322由来の pXX254共存下での
oriC プラスミドの安定性を調べた。図13Aに示すように、

pXX254は安定な oriC プラスミドに対しても不安定な

oriC プラスミドに対しても何ら効果を示さなかった(図11の

結果と比較せよ)。データは示さないが、C断片が逆向きに

挿入した pXX255が共存した時にも同様の結果であった。

これらの共存実験においてコピー数の多い pBR322由来の pXX254

や pXX255を失ったテトラサイクリン感受性菌の出現は認められ

なかった。次に C-A2断片を持つ pBR322由来の pXX167が

oriC プラスミドの安定性に及ぼす効果について調べた。すると

pXX167は単独では安定に保持される oriC プラスミド pXX199

の安定保持をわずかながら阻害し、pXX199の保持が少し不安定

となった(図13B)。一方、不安定な oriC プラスミド pXX206

と pXX253は pXX167の共存によって有意に安定化されることが

わかった。しかしながら別の不安定な oriC フォスミド pXX230

の安定性については 何の結果も認められず 依然として不安定な

ままであった。興味深いことに pXX167 共存下の pXX206

および pXX253 の安定性は pXX167 共存下の pXX199 の安定性

とほぼ同じであった。これらの結果は フォスミドの安定保持に

トランスに働く領域と スイスに働く部位が関係していることを

示している。トランスに働く領域 (sopA と名付ける) は pBR322

由来の pXX167 は持っているが pBR322 由来の pXX254 や

oriC フォスミド pXX206 は機能的に 活性な状態で持っ

ているので この領域は C 断片と A2 断片を区切る PstI

切断部位を含む領域であろう。一方 スイスに働く部位

(sopC と名付ける) は oriC フォスミド pXX206 や pXX253 は

持っているが pXX230 において欠失の起きている A2 断片中の

48.7-49.1 kb 領域にあるものと考えられる。さらにもう一つ

言えることは A2 断片中に oriC フォスミドの安定保持に対して

阻害的に働く領域があるということである。この阻害効果については

pBR322由来の pXX300 (図12) も同様の阻害を示すの2 (図14),

A2断片の Pvu I - EcoRI (47.6 - 49.5 kb) 領域内に

限定することができると。

そこで次に阻害的に働く領域を欠いているが、トランスに働く

領域を持つプラスミドが共存すれば A2断片のみを持つ

oriC プラスミドが安定な oriC プラスミドの安定性と同程度に

まで安定化されるのではないかと考え pBR322由来の pXX288

と共存させてみた。図13Cに示すように pXX288は もはや

oriC プラスミド pXX199の保持を阻害するといえなく、pXX250や

pXX206を安定化することができると。ところが Pvu II - EcoRI

(47.7 - 49.5 kb) 断片のみを持つ pXX253を安定化することは

できなかった。このことは pXX253が pXX167に比べて部分

的に安定化されるという図13Bに示した知見とは対照的である。

これらの結果から考えられることは、プラスミドの安定保持に関与

する機能には sopA の他に もう1つ別のトランスに働く遺伝子

(sopB と名付ける) があるといえる。oriC プラスミド pXX206は

この機能を持つが、pBR322由来の pXX288や oriCプラスミド

pXX253は 持たないの2. sopB遺伝子は PvuII (47.7 kb)

および HincII (47.9 kb) 部位を含む領域に存在すると

考えられる。以上述べた相補性実験の結果は表5に

まとめて示しておく。

図13Cに示すように 260塩基対 (bp) の欠失変異を含む

A2断片を持つ oriCプラスミド pXX226は 完全にA2断片を

持つ pXX206と同じように ほぼ完全に pBR322由来の pXX288

によって 安定化される。ところが、これより大きな欠失を持つ場合には

安定化の程度は 360bpの欠失 (pXX224) では 部分的、440bpの

欠失 (pXX230) では、まったく安定化されないという結果であった。

すでに述べた結果とも合わせて考えると、安定化のために シスに働く

領域 (sopC) は pXX230において 欠失の起きている領域で

あって、その活性は sopC 領域の塩基配列のみならず、その長さ

にも 関係していると思われる。

以上述べてきた結果をまとめて図15に示す。まず oriCプラスミド

pXX292とpXX279が安定に保持される(図10)ことから、

oriC プラスミドの安定化に必要なすべてのミニF機能は、ミニFの

HaeII-SalI (46.4-49.4 kb) 断片内に存在すると考えら

れる。その中に存在し安定化に必要な遺伝子または領域

は3つあり、その1つ sopA は HaeII-HincII (46.4-

47.9 kb) 断片内にある。このことは oriC プラスミド pXX279は

安定に保持されるが pXX250は安定には保持されないこと

(図10), および pBR322由来の pXX288がこの遺伝子活性

を持つ(図13C, 表5)ことから示される。47.3 kbの BstI

切断部位が sopA 機能にとって必須であることは pBR322株

の pXX288は oriC プラスミド pXX206を安定化するが pBR322

由来の pXX254は pXX206を安定化できない(図13A, C および

表5)ことから明らかである。また 46.9 kbの KpnI 切断部位も

必須であることは oriC プラスミド pXX250が不安定である(図10)こと

からわかる。もう1つのトランスに働く遺伝子 sopB は oriC プラスミド

pXX206が sopA を持つが sopB を持たない pBR322由来の

pXX288 によつて安定化される(図3C, 表5)ことから Pst I -

Sa I (47.3-49.4 kb)断片中に存在すると考えられる。一方

oriC プラスミド pXX253 や pBR322 由来の pXX288 が

sopB 機能を持つ(図3C, 表5)ことから Pvu II -

Hinc II (47.7-47.9 kb)領域が sopB 機能によつて)

必須であると思われる。最後にミスに働く sopC は

48.7-49.1 kb領域内にあると推定される。これらの遺伝子

または領域は複製したプラスミド分子が娘細胞に分配

される機構に働くものと推定される。

Ⅵ. C-A2断片によるpBR322の安定化

ミニFの C-A2断片による oriC プラスミドの安定化が複製

機構とは無関係で、この断片が分配機構を担っているためで

あることをさらに確認するため oriC プラスミド以外のプラスミドでも

この断片による安定化が起るかどうか調べた。pBR322は、

ColEI プラスミド群に属するいわゆる relaxed 型のプラスミドで

通常染色体当り約20コピー存在しているため、プラスミドの脱落は

極めて稀にしか起こらない。ところが、このプラスミドの複製は

大腸菌染色体や F プラスミドとは異なり、DNAポリメラーゼIの

活性に完全に依存しているため、DNAポリメラーゼIの活性

の弱い polA 変異株 (MM 383) においては、コピー数が少く、

安定には保持されない (図16)。そこでこの polA 変異株に

ミニFの C-A2断片を持つ pBR 322 由来プラスミド pXX 167

(図12) を入れ、その安定性を調べると明らかに pBR 322 に

比べて安定に保持されることがわかった (図16)。このことは、

ミニFの持つ分配機構は oriC プラスミドのみならず、pBR 322

においても機能していることを示している。すなわち、分配機構は

複製機構とは無関係に機能することが明らかとなった。

C-A2断片による安定化の程度は oriC プラスミドの場合

(図11) に比べて pBR 322 ではやや悪い (図16) ので、ミニFの

分配機構による安定化作用は、レプリコンによって多少差がある

という可能性が考えられるが、別の可能性、たとえばコピー数の違い

なども考えられ、容易に結論を下すことはできない。

VII. A2断片を pBR322 にクローン化した時に起る

特異的欠失変異 -

pBR322 と ミニ F の複合プラスミド pKP1033 を Pst I で

切断し、T4 DNA リガーゼで閉環すると ミニ F の Pst I 断片を

持つ pBR322 由来のプラスミドが得られるが、そのうちで最小の

プラスミドは pBR322 の EcoRI - Pst I 断片と ミニ F の A2

断片より成る 6.5 kb のプラスミドであると期待される。ところが

ミニ F 断片として A2 だけを持つプラスミドのほとんどが、期待される

ものより小さく pXX180 だけが、期待される大きさのものであった

(図 17)。制限酵素による解析からこれらの多くは A2 断片

の 48.7 - 49.1 kb 領域 (sopC 領域) に 約 440 bp の

欠失変異 を持ち 360 bp または 270 bp の欠失変異を持つ

ものも 少数あった。

このように A2 断片内の欠失変異は A2 断片と同時に他の

Pst I 断片が結合した場合には認められなかった(図17)。

すでに述べたように A2 断片を コピー数の少ないプラスミド(CoriC

プラスミド)にクローン化した時何の変化も認められなかった(pXX206,

図12)。また Pvu I - EcoRI (47.6-49.5 kb) 断片を

pBR 322 にのせても欠失変異は起こらなかった(図17)。

sopC 領域に欠失の起こる機構については推測の域を出ないが、

sopB 遺伝子産物の過剰産生が関係しているらしい(考察を

参照)。

VIII. C-A2断片内の不適合性遺伝子

Hプラスミドには3つの不適合性遺伝子 incB, incC および

incD が同定されており、それぞれ 45.1-45.8 kb, 45.8-46.9

kb および 47.6-49.4 kb 領域にマップされている(22,23,79)。

そこで C-A2断片内に存在する inc 遺伝子と我々の同定した

sop 遺伝子の関係を調べるため C-A2断片の種々の領域を

持つ pBR 322 由来のプラスミドを用いて 不適合性 (incompatibility)

を解析した。

図18に示すように C-A2断片全部を持つ pBR322由来の pXX167は 選択的条件下でも ミニFプラスミド pSC138と共存できず、完全に不和合である。これに対し pXX167は D, C および A2断片を持つ安定な oriC プラスミド pXX199とは必ずしも不和合であるが(図13B), 共存可能であった。同様に pBR322由来の pXX288と pXX254も pSC138とは不和合であったが、これらのプラスミドは oriC プラスミド pXX199とは完全に和合であった。pBR322由来の pXX167, pXX288 および pXX254が ミニFプラスミド pSC138に対して示す強い不和合性は incC の機能によると考えられる。ここで注目すべきことは oriC プラスミド pXX199は incC 遺伝子の不和合性に対しては全く非感受性であることである。このことは incC 遺伝子は Fプラスミドの複製制御に 特異的に関係していることを示している。

pBR322由来の pXX157や pXX300の pSC138に対する不和合性は incC 領域を持つプラスミドの不和合性より弱い。pSC138は

pXX157や pXX300と選択的条件下では共存できるが非選択的

条件下では安定に保持されない。非選択的条件下での pSC138の

脱落の頻度は pXX157との共存の場合の方が pXX300との共存の

場合より高頻度であった。pXX291, pXX294 および pXX256は

pSC138と安定に共存できる。これらの結果は A2断片内に2つの

不和合性遺伝子があることを示している; 一つは pXX157の持つ

断片上に存在し もう一つは pXX300の持つ断片上に存在する。

pXX291に見られる sopC 領域の欠失によって pXX300の持つ

不和合性が失われることから pXX300が持つ不和合性遺伝子は

最近明らかにされた incD 遺伝子と思われる(27,79)。一方、

pXX291に見られる PstI - PvuI (47.3 - 47.6 kb)断片の

欠失では pXX157の持つ不和合性が失われる。そこで我々は

pXX157の持つ不和合性遺伝子を incE と名付けた。incE

遺伝子による不和合性は pXX157や pXX179(図17)のようは

A2断片の2本が pBR322に結合したフォスミッドに限ってみられ

pXX167や pXX174のようは A2断片と他の PstI断片が同時に

結合したプラスミドでは見られないという点は注目すべきである。

このことは、すでに述べた A2断片内の特異的欠失と同様におそらく

sopB 遺伝子産物の過剰産生と関連しているであろう。pXX157や

pXX300は oriC プラスミド pXX199に対しても不和合性を

示す。その強さは pSC138に対しても同様に pXX157による

不和合性より強いが、いずれの

場合にも選択的条件下では共存可能である。このことは incDや

incE による不和合性は incC とは異なり、複製制御とは

無関係であることと示している。incD および incE 領域はそれぞれ

sopC および sopB 領域に対応するの2 (図15)、incD および

incE による不和合性は Fプラスミドの持つ分配機構に關係

していると思われる。

incE 遺伝子による不和合性は上に述べたような特殊な条

件下でのみ発現されるといふ点に加え、これに関連して2,3の

特異的な現象を観察した。pXX157などの incE 活性を

示すプラスミドと oriC プラスミド pXX199と共存せると、pXX199は

不安定で脱落しやすいのだが 選択的条件下で 培養した後

いくつかの クローンを単離してプラスミドの安定性を調べてみると

アンピシリン感受性の細胞 (pXX199が脱落した細胞) をもはや

生じなくなった クローンが見つかる。これらのクローンのプラスミド

DNAを抽出し構造解析を行うと 図19に示す pXX199-R1

および pXX199-R2のように共存する 2つのプラスミドが組換えを

起こして 複合プラスミドになっていることがわかった。また pXX199と

pXX154の組換えによって生じた pXX199-R2の持つ 2つの A2

断片には 両方共に欠失がみられ、一方は 270 bpの欠失で、これは

pXX154の持っていた欠失の大きさと一致するが、もう1つの 440bp

の欠失は、どちらのプラスミドの A2断片にも 本来なかったもので

2つのプラスミドの共存によって新たに生じたものと考えられる。

さらに 2つのプラスミドが共存している細胞からプラスミドDNAを

抽出し、プラスミドを持たないアンピシリン感受性の細胞をこの

DNAで形質転換して、アンピシリン耐性の形質転換体を得ると、

共存していたプラスミドのうち oriC プラスミドだけを持つ形質転換体は

得られる。このようにして得た形質転換体のプラスミドの構造を

調べると、この場合にも A2 断片内に欠失変異を起している

ものが見つかった。例えば pXX179 と共存していた

pXX199 に由来する pXX199-D1 や、pXX157 と共存していた

pXX253 に由来する pXX253-D1 である。これらのプラスミドにおける

欠失もそれぞれのプラスミドの A2 断片内で大きさは 440bp で

あった。A2 断片に 440bp の欠失を持つ pXX199-D1 はすでに

述べた図 11 の結果から予想されるように（構造的には図 10 の

pXX281 に相当する）pXX179 が共存し、条件下でも不安定

であった。

incE 活性を持つプラスミドの共存による欠失変異の誘発は

oriC プラスミドのみならず、ミニ F プラスミド pSC138 の場合にも

観察された。ただし、pSC138 が pXX157 と共存した時に

pSC138 の A2 断片内に欠失が起る頻度は oriC プラスミド

pXX199 の場合に比べて低く、また欠失の大きさも小さかった

（ $\leq 200\text{bp}$ ）。したがって図 13C の結果から予想されるように、これらの

ミニF欠失変異プラスミドの場合には pXX157 が共存している条件下では依然として安定に保持され、プラスミドの脱落は認められなかった。以上の結果は A2 断片内の incD 領域の欠失変異は incE 活性を持つプラスミドが同時に細胞中に共存する条件下で起こりうることを示しており、おそらく過剰産生した incE (sopB) 遺伝子産物が incD (sopC) 領域に作用するためであろう。なお前項および本項で述べた A2 断片内の特異的欠失変異 および 共存するプラスミド間の組換えなどの現象はすべて recA 株で観察されたことを強調しておく。

第2節 プラスミドの増殖と宿主細胞分裂の共役(56,59)

I. 安定な oriC プラスミド pXX299の作製

前節で述べたように、ミニFのC-A2断片を持つ oriC プラスミド
(例えば pXX199や pXX258など) は 非選択的条件下でも
安定に保持され、このC-A2断片は プラスミドの分配機構を
司るものと考えられる。

しかしながら、このようにして安定化された oriC プラスミドでも
本来のミニF プラスミド pSC138ほど安定ではなく、低頻度ながら
確かに プラスミドを失った細胞が出現してくる(図11)。さらに
oriC プラスミドを別の recA1 株(KZ200)に入れて、その安定性を
調べてみると、この株においては pXX199は KY7231株を
宿主としたときより、やや不安定で、プラスミドを失った細胞の出現頻度
は、少し高い(図20)。しかしC-A2断片を持つ分配機構が
機能していることは、欠失を含むA2断片しか持たない pXX230は
KY7231株を宿主とした場合と同様に不安定で、高頻度
に プラスミドを失った細胞が出現することから明らかである。また

ミニFプラスミド pSC138 は KZ200 株においても極めて安定に保持されるので (結果は本章第3節で述べる), pXX199 の脱落は有意であると思われる。これらの結果は ミニF が分配機構の他に安定保持に働く別の機構を持っている可能性を示唆している。もしそうであるなら その機能は複製 および 分配機構に必須な領域以外の DNA 断片に担われていると考えられる。このことは仮説を検証するため ミニF の XhoI 断片 (42.1 - 44.8 kb) を oriC プラスミド pXX258 の XhoI 切断点に挿入し、oriC プラスミド pXX299 を作製した (図21)。pXX299 は 図20 に示すように明らかに pXX199 より 安定に保持され その安定性は ミニF pSC138 と同程度であった。

前節で述べたように ミニF の分配機構を司る C-A2 断片内には 不適合性遺伝子 incD があり この遺伝子を持つ pBR322 由来 プラスミドが共存すると 分配機構によって安定化されたプラスミドが わずかに不安定となる。この現象を利用して incD を持つ プラスミド pXX300 (図12) を存在下の oriC プラスミド

pXX199と pXX299の安定性を比べれば Xho I断片が安定化に働いていることをさらに確かめることが、できるかもしれない。予想。

したがって、pXX300の共存に於て pXX299は少し不安定と見たが、pXX300共存下での pXX199ほどは不安定ではなく

(図22) 明らかに Xho I断片が結合したことに依り分配機構

といふ別の機構で pXX299の安定化が起こっていることがわかる。

またこの条件下での pXX299の脱落の頻度は、pXX300共存下での pSC 138の脱落の頻度とほぼ同じであった(後述)。以上の

結果より、分配機構を司る C-A2断片とこの Xho I断片が oriC プラスミドの完全な安定化に必要な成分であると考えられる。

II ミニFの特異的断片を持つプラスミドによる宿主細胞の増殖阻害

Xho I断片(42.1-44.8 kb)は プラスミドの安定保持に

必要で、しかも分配機構といふ果たす機構を担っていると考えられるが、

果してどのような機能であろうか。1つの可能性としてこの断片が、

プラスミドの増殖と宿主細胞分裂の共役機構を司っているのでは

ないかと考えた。そこでこの断片を持つプラスミドの複製が阻害

された時 宿主の増殖にどのような影響が現れるのかを解析

するため 種々のミニF断片を持つ pBR322 由来プラスミドを複製し

(図23), これらのプラスミドを polA^{ts} 株 (km1213) に導入し

42°C に移した後の細胞増殖を調べた。pBR322の複製は

polA 遺伝子産物である DNAポリメラーゼIの活性に依存し一方

ミニFの複製は DNAポリメラーゼIの活性がなくても起こるので

ここで使ったプラスミドのうち ミニFの複製に必須な領域を

持たないプラスミドは polA^{ts} 株において 42°C では複製できない。

図23に示したプラスミドのうち pXX312, pXX315, pXX306 等は

pXX344を持つ細胞の増殖は 42°C で顕著に阻害されることが

わかった。これらのプラスミドはすべて共通に HpaI-PstI (42.9-

43.6 kb) 断片を持っている。これに対し pKP1033, pXX304

等は pXX308 のように HpaI-PstI 断片を持ち しかも

ミニFの複製起点を使って 42°C でも複製可能なプラスミドが

入っている細胞では増殖阻害は見られなかった。同様に HpaI-

PstI 断片も ミニF の複製起点も持たない pXX167 や pXX338,

および HpaI-PstI 断片の一部だけを持つ pXX339 や pXX340 は

pBR322 や pSC138 と同様に宿主細胞を阻害しなかった。

これらの結果は HpaI-PstI (42.9-43.6 kb) 断片を持つ

プラスミドの複製が阻害された時にのみ宿主細胞の増殖阻害が

起こることを示している。

Ⅲ. 宿主細胞増殖阻害の経時的变化

プラスミドの複製阻害と宿主細胞の増殖阻害の関係をさらに調べる

ため pXX306 または pBR322 を持つ $polA^{TS}$ 株の濁度、生菌数、

プラスミドを持つ細胞の割合および宿主染色体の DNA 合成の

経時的变化を追った。pXX306 を持つ株では生菌数は

42°C に移して 3~4 時間 (4~5 世代) 後までは指数関数的に

増加し、その後増加は止まる (図 24A)。一方濁度の増加は

少なくとも 6~7 時間続く。プラスミドを失った細胞の出現は低頻度で、

7時間後でも 全生菌数の約10%であった(図24B)。これに対して

pBR322 を持つ株では 増殖阻害は 観察されず フラスコの

脱落した細胞は 7時間後には 約90%に達した。注目すべきことに

pXX306 を持つ株において 生菌数の増加が 止まり始める時間と

pBR322 を持つ株において フラスコを失った細胞が出現し始める

時間が ほぼ一致している。pXX306 を持つ polA^{ts} 株を 42℃で

5時間培養して 顕微鏡観察を行うと フィラメント状に伸びた

細胞が 高頻度で 認められ、細胞分裂が 阻害されていることが わかった。

一方 宿主染色体の DNA合成は 42℃でもほとんど 阻害されなかった

(図25)。

全く別の polA^{ts} 株 (MM383) に pXX306 を導入して 同様の

実験を行ったところ やはり 宿主細胞の 増殖阻害が 認められた

(図24C)。この株の DNA ポリメラーゼ I の活性は 30℃でも低く、

フラスコの コピー数は 少ない。そのため 30℃においても フラスコ

を失った細胞が 有意に 認められる(図24D)。pXX306 を持つ

この株を 42℃に移すと ほとんど すぐに 宿主の 増殖が 阻害されるが、

すでにプラスミドを失っている細胞は増殖を続けるため阻害効果は

km1213株の場合に比べて弱い。この株において pXX306は

pBR322に比べるとより安定に保持されるがプラスミドを失った細胞

が、やはり高頻度に出現している。しかしこれらの細胞の多くは

42℃に移した後に細胞分裂に伴ってプラスミドを失ったのではなく、

むしろすでに30℃でプラスミドを失っていた細胞が分裂増殖したもの

であろう。これらの結果はミニFの HpaI - PstI (42.9-43.6 kb)

断片 (ccd 領域と名付ける) を持つプラスミドの複製阻害によって

宿主細胞分裂の阻害が起こることを示している。しかしやはり km1213

(polA^{ts}) 株において ColEI 型のプラスミドの複製は高温に

移すとすぐに阻害されることが示されている (62) のに対して pXX306E

を持つ株を 42℃に移した後も 3~4 時間は正常に増殖する (図24A)

ことから考えると ccd 領域を持つプラスミドの複製阻害自体が

細胞分裂阻害の直接の原因であるとは考えにくい。むしろ細胞分裂の

阻害はプラスミドのコピー数が減少したことによって起こると考えた

方がよさそうである。この考えは 30℃でコピー数の少ない MM393 株

では 阻害効果が すぐに認められるという知見とも一致する。

IV. ccd断片を持つ pSC101由来プラスミドが宿主増殖に

及ぼす 効果

ccd断片を持つ pBR 322由来プラスミドを持つ polA^{TS}株の

細胞分裂が 高温で 顕著に 阻害されることが 示されたが、ここに

2つの問題点が 考えられる。一つは pXX306による 宿主細胞の

分裂阻害は pXX306の複製が 阻害され コピー数が 減少したこと

によるのではなく 高温で ポリメラーゼ活性を失った polAタンパク質が

ccd領域または その産物と 異常な 相互作用をして 細胞分裂を

阻害しているのではないかという可能性も 考えられること。もう一つは

このように プラスミドのコピー数が 減少したときに 宿主の細胞分裂を

抑えるという作用が、プラスミドを 安定に保持する機構として働いて

いるならば、oriC プラスミドの安定性についての 実験は recA株で

行われたので(図20)、この機構は recA株においても 働くはず

である。recA変異と polA変異の 二重変異株は 致死であることが

示されているので (63, 81, 82) recA 株での解析は pBR322由来プラスミド

を用いては行えない。これらの問題点を解決し ccd領域を

持つプラスミドが宿主細胞の増殖に及ぼす効果をさらに確かめる

ため、複製に必須なプラスミド機構自体が、温度感受性である

ベクタープラスミド上に ccd断片をクローニングすることにした。用いた

ベクタープラスミドは pSC101の複製に必須な領域を持ち、その複製が

温度感受性になった変異プラスミド pHSG415(67)であり、これは

pXX306の ccd領域を含む断片を結合して pXX333を得た(図26)。

同様の操作によって pHSG415の欠失変異株 pXX332も得た。

親プラスミド pHSG415 および pXX333の持つ pHSG415由来の

DNA領域にほぼ匹敵する pXX332を対照として pXX333が

宿主細胞増殖に及ぼす効果を調べた。まず polA⁺ recA⁺株

(KH802)に pXX333を導入し 42℃に移した後の宿主の細胞

増殖を調べると、生菌数の増加は 約2.5時間(約3世代)

後から著しく阻害された(図27A) プラスミドを失った細胞は 4.5

時間後でも ほとんど(<5%)出現しなかった(図27B)。また

顕微鏡観察により 細胞が著しく伸びていることが認められた。

一方 pHSG 415 や pXX 332 を持つ株では 細胞の増殖阻害は

起こらず、プラスミドの脱落は 2 ~ 2.5 時間後から始まって、

4.5 時間後では 80% 以上の細胞が プラスミドを失っていた

(図 27 A, B; pHSG 415 についての結果は示していない)。これらの結果

は上に述べた pBR 322 由来プラスミドを用いた解析の結果とよく

一致している。

pXX 333 を polA⁺ recA 株 (K8 200) に導入すると 生菌数の

増加はやはり pHSG 415 または pXX 332 を持つ K8 200 株に

おいて プラスミドの脱落が始まる時刻 (42℃に移してから 3 ~ 3.5

時間後) とほぼ同じ時刻に止まり、プラスミドの脱落はほとんど

起こらない (図 27 C, D; pHSG 415 についての結果は示していない)。

このことは recA 遺伝子の活性に依存せず ccd 機能が正常に

宿主細胞分裂を阻害し、おそらくその結果として プラスミドの脱落を

抑えるということを示している。ただし pXX 333 を持つ K8 200 株 (recA)

では 42℃で増殖させても細胞の伸長はほとんど観察されなかった。

上に述べたように recA⁺ 株においては ccd 領域を持つプラスミド
の複製が 阻害されたとき 顕著な細胞伸長が観察されるので、

この現象は SOS 反応 (83) の 1 つではまいかと 思われる。ただ

recA⁻ 株では 死菌が生じやすく実際 KH200 株 (recA⁻) の

濁度当りの生菌数は KH802 株 (recA⁺) の 1/5 程度であった。

顕微鏡観察では 両株の細胞の大きさに 顕著な差は認められ

ないので recA⁻ 株では 死菌が多数出現しているものと考えられる。

したがって 生菌中に伸長した細胞が含まれていても顕微鏡観察

では 検出できないという可能性も否定できない。

V. ccd 領域を持つ複製可能なプラスミドの共存による

増殖阻害の抑制

ccd を持つプラスミドのコピー数の減少が 細胞分裂の阻害を

引き起しているのなら ccd を持つ polA^{TS} 株で複製可能な

プラスミドが 共存すれば 分裂阻害は 抑制され 宿主細胞は正常に

増殖するだろう。 このことを確かめるため pXX306 を持つ polA^{TS}

(km1213)株に ミニFプラスミド pSC138を入れた。42°Cでの増殖を

調べた。その結果 pXX306とpSC138が共存する polA⁺株の

増殖は 期待したように 高温に移しても 阻害されなかった。同様に

pXX333を持つ polA⁺株 (KH802)に この株では 42°Cでも複製

可能な pXX306を入れたとすると 増殖阻害は 抑制された(図28)。

→ ccd領域を全く持たない pXX256は そのような抑制効果を示さず

pXX333とpXX256が共存する KH802株の増殖阻害は

依然として観察された。これらの結果は ccd領域を持つ

プラスミドの複製阻害による宿主の増殖阻害は ccd領域を持つ

複製可能な プラスミドの共存によって 抑制されることを示している。

次にこの抑制作用を示す領域についてさらに詳細に検討した。

まず 5'断片全体を持つ pKP1033は pXX306と同様に抑制作用

を示すが、ccd領域の一部を欠失した pXX314は もはや抑制作用

を示さない(図28)のど の抑制作用は ccd領域に特異的で

あると考えられる。少なくとも ミニFの複製に 必須な領域(44.0-

46.35 kb)や分配に 必須な領域(46.4-49.4 kb)には そのような

活性がないと結論してよいだろう。一方、ccd領域の一部を持つ

pXX339やpXX340はpXX306と同様に抑制作用を示すことが

わかった。この2つのプラスミドは本節IIで述べたようにその複製が

阻害されたとき、宿主増殖を阻害するという性質は示さなかったプラスミド

である。最後に ccd 領域の一部を持つが、その領域はpXX339

やpXX340よりさらに短いpXX335は抑制作用を示さなかった。

以上の結果より pXX334(図23)の持つ ccd 領域、HpaI - PstI

(42.9-43.6 kb) 断片内には 2つの機能領域があり、1つは宿主細胞の

増殖を阻害する機能を持ち、もう1つは、その阻害作用を抑制する機能

を持つていると考えられる。pXX340が抑制作用を示すことから

抑制機構を司る領域 (ccdA と名付ける) は HpaI - RsaI

(42.9-43.35 kb) 断片内に存在し、阻害機構を司る領域 (ccdB

と名付ける) は HpaI - PstI (42.9-43.6 kb) 断片内にあるが、

少なくとも HpaI - XmaI (42.9-43.35 kb) 断片は、ccdB 活性

を示さない(図23と28参照)。

VI. ccd領域を持つプラスミドの共存が pXX299の

安定性に及ぼす効果

ここでは述べてきた ccd領域の性質から考え、もし pXX299が

pXX199より安定に保持される理由が XhoI断片(42.1-44.8kb)

内の ccd領域の働きによって宿主の細胞分裂がプラスミドの増殖に

共役するためであるならば、ccd領域を持つ別のプラスミドが共存すること

によって pXX299の安定性は pXX199と同程度になる、つまり少し不安定に

なるということが予想される。なぜなら pXX299が複製してはいくつか

が、おそらく細胞当たり1個しかなくても ccd領域を持つ別のプラスミド

の存在によって ccdBによる阻害作用は抑制され、細胞分裂が

起るだろうから、予想通り ccd領域を持つ pXX306が共存

すると pXX299の安定性は他のプラスミドの共存していない時の pXX199の

安定性(図20)とほぼ同程度で(図29)、XhoI断片による安定化

が解除されたものと考えられる。一方 ccd領域を持たない pXX256

(図28)は pXX299の安定性に対しては、何ら効果を示さず XhoI

断片による安定化は ccd機能によることが強く示唆される。

VII ccd 領域による増殖阻害に非感受性の宿主変異株の
分離。

pXX306 を持つ polA^{ts} (km1213) 株から 自然突然変異によって高温

でも増殖阻害を受けなくなった変異株が独立に数株分離された。

このように変異株の中には、プラスミド側の変異株と宿主側の変異株が

含まれる可能性がある。プラスミド側の変異としては ccdB 遺伝子が

失活し、阻害効果を示さなくなった変異か、または ccdA 遺伝子が完全に

無関係に常に抑制作用を示すようになった変異が考えられる。一方

宿主側の変異としては polA^{ts} が polA⁺ に復帰突然変異を起し

高温でも pXX306 が複製できるようになった変異か、あるいは、プラスミドの

ccdA または ccdB 遺伝子(産物)と相互作用する宿主側の遺伝子が

変異したため ccdB による阻害作用を受けなくなった場合が

考えられる。変異株のいくつかを調べてみると 高温でプラスミドの脱落

が 高頻度に起り、また依然として紫外線感受性を高温で示すこと

から polA⁺ 復帰変異株ではないことがわかった。そこで次にプラスミド

の脱落を、フローントに再び pXX306 を導入し、宿主の増殖を 42°C

に移して調べてみると、やはり増殖阻害はみられなかった。したがって

これらの変異株は、プラスミド側の変異ではなく、polA遺伝子以外の

宿主染色体上の遺伝子に変異が起って ccd による阻害に対して

非感受性になったと思われる。これらの変異のマッピングなど詳しい

解析はまだ行っていないが、このような変異株が分離できると

いうことは、ccd 機能が宿主の遺伝子と相互に作用して プラスミド の

増殖と細胞分裂の共役を司っていることを示している。

第3節 ミニF プラスミドの安定性

I ミニF プラスミドの欠失変異株

本章第1節、第2節で述べたように、ミニF プラスミドには複製機構の他に、プラスミドの分配機構や宿主細胞分裂とプラスミドの増殖の共役機構を司る領域があり、これらの機構を別々に取り出して oriC プラスミドなどの他のプラスミドに ついで、その機構を解析することができた。本節では、これらの機能が実際に本来のミニF プラスミドにおいても同様の機能を果たし、その安定保持に働いているかどうかについて検討した結果について述べる。

まずミニF プラスミドの欠失変異株を系統的に作製した。f5断片全体とアンピシリン耐性断片の結合した pSC138(4) と親プラスミドとして BamHI断片を欠失した pXX9を得た(図30)。このプラスミドからさらに SalI断片を欠失させ pXX317を PvuI断片を欠失させ pXX318をそれぞれ作製した。一方 pXX314(図28)を EcoRIで切断し、アンピシリン耐性断片と結合して pXX325を得た。pXX325のミニF断片とアンピシリン耐性断片の結合の向きは、pSC138と同じ

である。pXX325を作製する際、いくつかの自然欠失異株が得ら

れたので、ここでは別に図31にその構造を示す。pXX325から

さらに SalI断片を欠失させ pXX326を PvuI断片を欠失させ、

pXX327を得た。もう1つのプラスミド pXX344は pKP1033の

KpnI断片(43.6-46.9 kb)を逆向きにつなぎかえたプラスミドの

EcoRI - SalI断片(ミニF断片)とアピシリン耐性遺伝子を含む

EcoRI - SalI断片を結合して得た。

II. ミニFプラスミドの安定性

ミニFプラスミドの安定性を KY7231(recA1)株を使って調べると

pXX9, pXX317, pXX325 および pXX326は、親プラスミドのpSC138

と同様に安定に保持されたが、pXX318, pXX327およびpXX344は、

不安定であった(図32)。oriCプラスミドを使った解析から、ミニF

の PvuI - EcoRI(47.6-49.5 kb)断片は、分配機構に必須な

機能領域のうち、少なくとも2つ(sopBとsopC)を含んでいる。KpnI

切断点は、もう1つの sopA遺伝子の活性に必須であることが示され

いるので pXX318, pXX327 および pXX344 の不安定さは、主に

分配機構の欠損によると考えられる。しかしながら pXX327 は

明らかに pXX318 および pXX344 よりさらに不安定である (図32)。

このことは pXX327 が BamHI - XmaI (42.85-43.35 kb) 断片

を欠失していることより、分配機構とは別の安定化に必要な機構を

失ったためであることを示しており、その機構は ccd 領域による宿主

細胞分裂とプラスミドの増殖に共役させる機構であろう。また図31

に示した自然欠失変異プラスミドの安定性は、いずれも pXX327 と同程度

であり (結果は示さない) これらのプラスミドに起こった自然欠失変異が、

分配機構に必要な領域内であることをから考えて、この結果は当然と言える。

pXX344 の安定性は pXX318 とほぼ同じであり、これはより KpnI

(43.6 kb) 切断点は ccd 機構に必要な領域内にあることもわかる。このように

ミニFプラスミドの安定保持にも確かに分配機構と細胞分裂共役機構

が関与していると推定されるが、pXX325 と pXX326 は pXX327 と

同様に ccd 領域の一部を欠失しているにもかかわらず極めて安定に

保持され、pSC138 との差は検出できなかった。このことはミニFプラスミド

に おいては、分配機構を持つ場合には、細胞分裂共役機構を失っても、ほとんど安定性は影響されないことを意味しており、oriC プラスミドの場合とは、少し様子が異なる。この差については、後で少し考察するが、詳しいことは不明である。

III. ミニF DNA断片を持つプラスミドの共存が

ミニFプラスミドの安定性に及ぼす効果

oriC プラスミドにおいて、incD (sopC) 領域あるいは ccd 領域を持つ pBR322 由来プラスミドが共存したとき、プラスミドの安定性が影響されることをすでに述べた。同様の効果がミニFプラスミドにおいてもみられるかどうか検討した。

まず PstI - PvuII (47.3-47.7 kb) 領域を持つ pXX256 (図28) は、分配機構を司る領域 (sop 領域) を持つが、細胞分裂共役機構を司る領域 (ccd 領域) の一部を欠失したミニFプラスミド pXX325 に対しても ccd 領域を持つが、sop 領域の一部を欠失した pXX318 に対しても、何ら効果を示さなかった (図33A)。

pXX256の持つ PstI-PvuII領域は sopA, sopB 遺伝子の一部

を含むが、sop機構を獲得して安定となった oriC プラスミドおよび

ミニFプラスミド pSC138の安定性は pXX256が共存しても変化しない

ことが示されており(図29)、これらの結果と一致する。ところが sopC

(incD) 領域を持つ pXX300(図18)は sop機構による安定化を

阻害し oriC プラスミドや pSC138を不安定にすることがわかっている

(incDによる不和合性)。pXX300が共存したときの pSC138の

安定性を図33Bに示すが、明らかに pXX300の共存によって分配

機構が阻害されて不安定となることがわかる。すなわち sop機能を

欠損している pXX318や pXX344は pXX300が共存しても安定性は

変化しない。さらに sop領域を持つが ccd領域の一部を欠失した

pXX325は pXX300の共存によって著しく不安定となる。pXX300

が共存しない場合には pXX325は pSC138と同程度に極めて

安定に保持されるが、pXX300が共存したときの安定性は明らかに

pXX300が共存したときの pSC138よりさらに不安定であり ccd領域

の一部を欠失していることの影響が現れている。このことは sop領域

および ccd 領域の両方に欠失変異を持つ ミニ F_pXX327 が、

sop 領域のみ欠失している pXX318 よりさらに不安定である (図 32)

という結果と一致する。

一方、ccd 領域を持つ pXX306 の共存によって ccd 領域の

一部を欠失している pXX325 は影響を受けず、sop 領域に変異を

持つが 完全な ccd 領域を持つ pXX318 や pXX344 は

影響を受け、さらに不安定となる (図 33 c)。この結果も oriC

プラスミドで観察された結果 (図 29) と一致している。以上述べた

結果は ミニ F プラスミドにおいても 分配機構 および 細胞分裂

共役機構が安定保持に働いており、それぞれの機構は独立に

機能することを示している。

第4章 考察

第1節 分配機構

安定に保持される oriC プラスミドは ミニF プラスミドと結合

すると ミニF の複製が 抑えられた条件下 (Hfr 株 又は mafA 株)

でも 安定に 保持されるようになることがわかった (図 7)。この oriC

プラスミドの安定化に必要な ミニF DNA 断片は Hae II - Sal I (46.4

-49.4 kb) 断片であることがわかり ミニF プラスミドの自律増殖に必要な

領域の外側に位置している (図 4 と 15)。 亦 この断片により安定化

された oriC プラスミドのコピー数は 不安定な oriC プラスミドの

コピー数と ほぼ同じである (表 4)。これらの結果は ミニF 断片を持つ

oriC プラスミドの安定保持は複製調節機構ではなく分配機構に

関することを示している。

分配機構が ミニF の複製機構とは独立して機能することは

oriC プラスミドのみならず、pBR322 も ミニF の C-A2 断片により安定化

されること (図 16) や 分配機構を失った R1 プラスミドは ミニF の 46.19

-49.5 kb 断片と結合するとやはり安定に保持されるようになること

(文献18の考察において Nordström からの私信として引用されている)からも明らかである。

ミニFのC-A2断片内には フラスミドの安定保持機構に必要な領域が少なくとも 3つあることがわかった。このうち sopA と sopB は フラスミドの安定化のために トランスに働き、sopC は リースに働く。

sopA と sopB 遺伝子は 分子量 41-44 kd と 36-37 kd のタンパク質をコードする領域に相当すると思われる (80, 84) (図15と34)。これから

sopA および sopB の遺伝子産物が トランスに働いて フラスミドの分配を遂行するのであろう。 sopB と sopC を含む A2断片のみを pBR322に

クローニングすると sopC 領域に 特異的な欠失変異が 高頻度にかかる

(図17)。この欠失変異はおそらく sopB タンパク質の過剰産生に

よるのではないかと思われる。実際、このような欠失の起こった A2断片

のみが クローニングされた pBR322 由来の フラスミドを持つ菌では

36 kd タンパク質の過剰産生が観察され、このタンパク質は細胞の

膜分画に存在すると報告されている (88)。A2断片とともに C

または D断片が A2断片の左端 (47.3 kb) に挿入された場合には

その挿入断片の向きにかかわらず sopC 領域の欠失は起らない

ので(図17), 単にコピー数の高いベクターに sopB 遺伝子が

クローニングされたことによる遺伝子量効果だけでなく、おそらく pBR322 の

断片から開始した転写が A2断片にまで及ぶ(read-through)

ためであろう。またこれとは別に、早川と松原(89)は sopB 遺伝子

産物である 37kd タンパク質が、ちょうど sopC 領域に相当する DNA

領域に結合する活性のあることを見出し、この時 37kd タンパク質と

同時に、おそらく宿主遺伝子産物と思われる少なくとも2つのタンパク質

(75kd と 33kd) が sopC 領域に結合することと明らかにした。

さらに吉岡ら(57)は sopC 領域の塩基配列を決定し、その結果

40塩基対のくり返し配列が、少なくとも8回、おそらく10回以上

この領域にあることと明らかにした。これらの結果から考えて、sopB タンパク質

は、sopC 領域に結合して複合体を形成するものと思われる。そして

sopB タンパク質が過剰に細胞内で作られ、その結果 37kd-sopC

複合体が多量に形成されることが、細胞の増殖にとって何らかの

不都合をもたらす。その効果から逃れるように sopC 領域に欠失変異が

誘発されるのではないかと考えられる。図17に示した欠失変異の長さは

3種類とも ほぼ40塩基対の倍数となっており ($440 = 40 \times 11$,

$360 = 40 \times 9$, $270 = 40 \times 7$), くり返し構造が単位となつて

欠失したものと考えられる。

以上述べてきた結果から Fプラスミドの分配機構についてのモデルを
提唱する (図35)。まず sopC 領域は 次のような事実から判断

して 分配のために必要な 特異的部位としての役割を果たすと

考えられる; (i) sopC 領域は ツストにのみ働くこと (図13Bと表5),

(ii) pXX224の場合のように 中位の長さの欠失変異 (360bp)

は sopC 機能を部分的に欠損させると, そして (iii) sopB タンパク質

が sopC 領域に 特異的に結合すること, プラスミド分子上の sopC

領域は sopB タンパク質 (37kd) と少なくとも 2つの宿主タンパク質

(75kd と 33kd) からなる 細胞成分と相互作用するのであろう。

sopB タンパク質は sopC 領域に 結合することにより プラスミドDNA

分子を細胞成分に 会合させるのか, あるいは sopB タンパク質が 活性

のある細胞成分の 1因子であつて sopB タンパク質を含む成分だけが

sopC領域と相互作用できるのかもわからない。一方 sopA産物の機能

については現在のところ不明である。sopAタンパク質(41kd)も sopC

領域と相互作用するのかもわからない。あるいは間接的に sopC領域

と会合して細胞成分と相互作用するのかもわからない。または sopB

遺伝子の発現を制御するのかもわからない。ここで仮定する分配装置

は sopB タンパク質が膜タンパク質であることから考えておそらく

細胞膜と関係があるだろう。分配機構が細胞膜と関係している

だろうという考えは古くから提唱されている(6)が、実験的証明は

少なく、これまでわずかに Staphylococcus のプラスミドを使って

安定保持膜が関係していることが示されている程度である(90)。

またこれとは別に Fプラスミドを始めとしていくつかのプラスミドは

宿主染色体と会合しているという報告もあり(91,92), この会合によって

プラスミドの分配が行われているのではという考えもあるが、

まだその解析は不十分で分配機構との関係は現在のところ

よくわかっていない。

最近 Meacock と Cohen (34) は pSC101 の分配機構は

プラスミドの複製機構とは直接関係なく 別の分配機構を欠損

したプラスミドに分配機構を司ると思われる断片を結合すると

プラスミドの保持が安定になると報告しており、ここで述べた

F⁻プラスミドの分配機構の結果とよく一致している。しかし pSC101

の分配機構を司る領域 (par 領域) は シスに働く部位を

含んでいるが、ミニF⁻プラスミドの sopC のように 不適合性を示すた

い、par 領域の長さは約 270 bp で 塩基配列は すでにわかっ

ているが (93)、ミニF⁻の sopC に見られるような くり返し配列は 認

められない。また、この領域内に何か タンパク質がコードされている

可能性も少ないようだ。したがって pSC101 の場合には、par 領域

に作用する タンパク質があるとすれば 宿主遺伝子産物であろうと

思われる。また、少なくとも ミニF⁻の sopC (incD) が 不適合性を

示すという結果は 不適合性の主な要因は コピー数制御機構が

あろうが、分配機構に関連した 不適合性もあるという仮説 (94-96)

を支持しているようだ。ミニF⁻-oriC 複合プラスミド pXX11 は

mafA 株では 極めて安定に保持されるが、Hfr 株では 必ずかに

不安定であるという結果(第3章第1節Ⅱ)は、この incD による

不適合性のためであると考えられる。

F_{poh} プラスミドは Hfr 株でも複製するプラスミドとして報告

され(97)、その後の解析により poh 部位が oriC に相当することが

明らかになったが(98)、安定には保持されないとされていた(97)。

また同様の不安定性は F-株においても観察され、本論文で

報告した F プラスミドの分配機構による oriC プラスミドの安定化という

現象と一見矛盾するように見える。しかし最近の解析によって F 細胞

における選択マーカー(Ilv⁺)の不安定性は、プラスミドの脱落による

のではなく、プラスミド上の ilv-oriC 領域の欠失によることが明らか

となり ilv-oriC 領域の構造的不安定性の理由は不明であるが

プラスミドの安定保持という点での疑問は、たかまった。

第2節 細胞分裂共役機構

ミニFの分配機構を司るC-A2断片が結合した oriC プラスミド

は 安定に保持されるが 厳密には その安定性は 本来のミニFプラスミド

とまったく同程度ではなく やすく失われる。この点についてさらに検討

したところ ミニFの 安定保持には 分配機構の他に もう1つの機構が

関与していることがわかった。その機能を担っている領域(ccd領域)

は HpaI - PstI (42.9-43.6 kb)断片内にあって、この領域を持つ

プラスミドのコピー数が おそらく細胞当たり1個にまで減少した時に 宿主

菌の細胞分裂が 阻害されることから 宿主細胞分裂を プラスミドの増殖

と共役させているものと考えられる。さらに この ccd断片内には 2つの

機能領域があり 1つ(ccdB)は 細胞分裂を阻害する働きを持ち、

もう1つ(ccdA)は ccdBの阻害作用を抑制することがわかった。また

ccdAの作用は、トランスに働くことが示された。

三木ら(53, 99, 100) Fプラスミドのアンバー変異株を多数分離し、

その中から アンバーサプレッサー変異(sup⁺)株には 正常に伝達されるが

sup⁻受容菌との接合においては 受容菌を殺す(接合致死)変異株を

見出し. let 変異株と名付けた。そのうちの1つ letA 変異株は sup⁻

受容菌に伝達された時、受容菌の細胞分裂を著しく阻害し、宿主菌は

フィラメント状になって死ぬことがわかった(53,99)。また受容菌が溶解

原菌の場合、フロファージの誘発が起こる(53,99)。letA 変異の

マッピングを行うと自律増殖能を持つ EcoRI f5 断片内にマッ

されたので、最初自律増殖に必須な遺伝子では無いかと考えられたが

(101)、詳しい解析の結果、自律増殖に必須な領域の外側に

PstI A1 断片内であることがわかった(55,58)。さらに letA 変異が

野生型の M13 フラスミドの BamHI - XmaI (42.85 - 43.35 kb)

断片によって相補されることを示し、letA 変異は、この領域内に

起こった変異であると結論された(102)。さらに彼らは BamHI - PstI

(42.85 - 43.6 kb) 領域の塩基配列を決定し、この領域内に分子量 8 kd

と 11 kd の γ -127 質をコードする配列を見出した(57,58)。8 kd および

11 kd γ -127 質の遺伝子は、それぞれ 43.05 - 43.27 kb および 43.28

- 43.58 kb 領域で転写は、8 kd γ -127 質の遺伝子を先頭に起こる

と考えられ、実際 8 kd γ -127 質の遺伝子の上流には、転写開始の

信号となる塩基配列が認められた。これらの結果より 8kd タンパク質

の遺伝子が letA 遺伝子であろうと推定され、11kd タンパク質が細胞

分裂阻害作用を持ち、letA タンパク質 (8kd) がその阻害効果を

抑制するのであると推定された。この仮説を支持するよう、11kd

タンパク質の遺伝子を含有する letA 遺伝子を含有する HincII-PstI

(43.1-43.6 kb) 断片は 宿主菌として F' 菌を使えば クローニング

できるが、F- 菌では クローニングできないことが示された。この場合には、

当然、11kd タンパク質は本来のプロモーターからではなく、ベクター

(pBR322) の断片内で開始した転写が 11kd タンパク質の遺伝子に

及ぶものと推定される。

以上の結果を総合して、ccd 領域が プラスミドの安定保持に働く

モデルを提唱する。少なくとも ccdA 活性には、letA 遺伝子が必須

であって、その遺伝子産物は、普通 ccdB 遺伝子産物による細胞分裂

阻害作用を抑制していると考えられる。プラスミドのコピー数がおそろく

細胞当たり 1 になると ccdB 遺伝子による阻害作用は、むしろ抑制され、

細胞分裂は一時的に止まる。そしてプラスミドが複製し、コピー数が

2以上になると ccdA の抑制作用が再び活性となり細胞分裂が起こる。この際、プラスミドのコピー数に伴って活性の変化するのは ccdA 遺伝子活性であって、もし ccdA 遺伝子が letA 遺伝子そのものであるならば、ccdA 遺伝子の遺伝子量効果によって抑制作用のオン・オフが決まると考えるのが最も単純なモデルである(モデル1)。この時 ccdB 遺伝子の活性はコピー数に無関係に常に活性状態にあると考えられる。もう1つの可能性としては letA 遺伝子はこの遺伝子のアンバー変異によって抑制作用が失われるのであるから少なくとも ccdA 活性に必須であると思われるが、ccdA 活性のオン・オフを制御するのは letA 遺伝子自身ではなく、ccdA 活性を制御するもう1つの機能領域が存在するという考えも成り立つ。もちろんこの領域も BamHI-XmaI (42.85-43.35kb) 領域内。もう少し厳密に言えば、pX334 (図23) pX340 (図28) の持つ共通領域 HpaI RsaI (42.9-43.35kb) 領域内にあると考えられる。この領域が

細胞内におそらく2コピー以上存在する時に letA 遺伝子産物が

活性化され ccdB の阻害効果を抑制するというモデルである

(モデル2)。いずれのモデルにせよ ccdA の抑制効果は ccdB

遺伝子の発現調節に及ぼすとは考えにくい。なぜならば letA 遺伝子

と 11 kd タンパク質の遺伝子 (おそらく ccdB 遺伝子) は 単一のオペロン

を形成していると推定され、ccdB 遺伝子のみが pBR 322 に結合

した時には 本来のプロモーターは持たないと考えられるが、F'プラスミド

上の ccdA によって ccdB の阻害効果は抑制されると考えられるから

である。ただし ccdA が ccdB 遺伝子の翻訳段階での調節に

働くという可能性は十分に考えられる。

ccd オペロンの発現については Komai S (80) の報告がある。

彼らはミニセルを使って ccd 断片にコードされるタンパク質を同定しそのうちの

いくつかについては塩基配列との対応を確認している。その結果 ccd

オペロンのところには 11 kd (彼らのゲルでは 12 kd と推定されている) タンパク質

の遺伝子に近く近接して その下流領域に 28 kd タンパク質をコードする

遺伝子が存在することがわかった (図34)。この遺伝子の5'末端は

Pst I (43.6 kb) より 左側に位置しており 確かに吉岡ら (57) の決定した

BamHI - PstI (42.85-43.6kb) 領域の 11kd タンパク質の遺伝子に
近接して 28kd タンパク質の遺伝子の 5' 末端付近に 相当すると思わ
れる配列が認められる。ただし 彼らの実験条件では 10kd 以下の
タンパク質は 検出されないで、8kd のタンパク質は 未同定である。これらの
結果を考えると、28kd タンパク質も ccd の機能にとって重要な
機能を果たしているかもしれない。もちろん プラスミドのコピー数が減少した
時に 宿主の細胞分裂を阻害するという効果は 28kd タンパク質の
遺伝子を含む ccd 領域を持つ プラスミドにおいて観察されるので、
少なくとも この現象には 28kd タンパク質は 関係していない。しかし
oriC プラスミドの安定化のために 結合した XhoI 断片 (42.1-44.8kb)
は この遺伝子領域も 完全に含んでおり プラスミドの安定保持の
ためには 何らかの役割を果たしている可能性も残る。しかしこの可能性
は 次に述べる ミニF プラスミドの解析結果からは 否定的である。

ミニF プラスミドの KpnI 断片 (43.6-46.9kb) を 逆向きに つなぎかえた
プラスミド pXX344 (図30) は 46.9kb の KpnI 部位が sopA 遺伝子内
にあるために 分配機構が欠損し 不安定となるが (図32)、分配機構と

細胞分裂共役機構を両方とも欠損した pXX327 よりは安定であり

また ccd 領域を持つ pXX306 の共存実験からも pXX344 が

ccd 機能を依然として持っていることが示されている(図33)。したがって

28 kd タンパク質の遺伝子内にある 43.6 kb の Kpn I 部位は ccd

機構にとって 必須ではなく、28 kd タンパク質がプラスミドの安定保持

に働いていると考える根拠は今のところない。しかしながら Kpn I

断片が逆転してつなげたことにより 28 kd タンパク質の N 末端の構造

が変わっても 本来の活性は失われない形で このタンパク質ができて

いるという可能性は否定できていない。

ミニ F プラスミドの複製制御は 少なくとも inc C や おそらく複製開始に

必須と思われる 29 kd タンパク質の遺伝子(図34)によって行われていることは

ほぼまちがいない。これらの遺伝子に変異の起った コピー数変異株が

分離されている(14, 18-20)。しかしながら 序論でも述べたように ミニ F プラスミド

の複製の時期は 細胞分裂周期や 宿主染色体の複製周期とは

共役していないことが示されている。したがって おそらく大部分の細胞に

おいては 1 世代の間に プラスミドのコピー数は倍化され 分配機構に

よって 娘細胞に分配されていくのであろうが、細胞集団中には、頻度は

少ないが、プラスミドの複製が1回も起らず細胞分裂の時期に

なってもプラスミドが細胞当り1コピーしか存在しないという状況が起

こりうるのではないかと。もしそのような細胞が分裂すれば、いかに分配

機構を備えていても、プラスミドを失った細胞が出現することになる。

ccd領域は、そのような細胞において細胞分裂を一時的に阻害

することによって、プラスミドを失った細胞の出現を抑制し、結果として

プラスミドは安定に保持されるのではないかと考えられる(図36)。

ただ、普通ミニFプラスミドの複製は、先ほど述べたような遺伝子の

働きによって相当にうまく制御されており、細胞分裂時にたっても

プラスミド分子が1コピーしか存在しないという状況は極めてまれで

あるために、ccd領域を欠失した場合でも、プラスミドを失った細胞が

出現することはめったにないのではないかとと思われる(図32のpXX325の

安定性を見よ)。しかし、同時に分配機構に必須な sop領域も

欠失した場合には、細胞分裂の際に、それぞれの娘細胞に受け渡

されるプラスミド分子の数には、やはりばらつきが生じるだろう。このように

ばらつきは コピー数の調節に乱れをもたらすかもしれない。もしそう

であるならば、分配機構を失ったプラスミドの場合には、プラスミドの

安定性に及ぼす ccd 領域の効果がより顕著に現われるのでは

ないか。図32の pXX318 と pXX-327 の安定性の差は、このためでは

ないかと推定される。oriC プラスミドの場合には、F プラスミドの

分配機構をもっている ccd 領域をもつかもたないかに、その安定性

の差が実験的に検出された(図20)。このことは oriC プラスミドの

複製が、ミニFプラスミドほどうまく制御されていることを示している

のではないだろうか。そうだとすれば sop 領域を持つが ccd 領域を

持たない oriC プラスミドとミニFプラスミドの安定性の差は説明できる。

さらに述べたように letA 変異によって受容菌の細胞伸長が起こることや

受容菌が入浴原菌のときは入ファージが誘発されることが観察されている。

同様に ccd 領域を持つプラスミドの複製が阻害され、コピー数が

低下した時 recA⁺ 株では細胞の伸長が観察されるが recA 株

では細胞の伸長は認められなかった。これらの現象は DNA 分子に

おきた損傷または DNA の複製阻害に対応する一連の細胞反応

いわゆる SOS 反応の特徴のように見える。これに関連して 間接誘発

という現象が古くから知られている(103)。λ 溶原菌を感受菌として

UV 照射した F プラスミドや ColIb を接合導入したり、UV 照射した

P1 ファージを感染導入すると、λ ファージの誘発が起るという現象が

ある(103, 104)。ところが感受菌が Hfr 株のときには UV 照射した

F プラスミドが導入されても λ ファージの誘発はみられない。同様に

P1 溶原菌は UV 照射した P1 ファージ DNA が導入されても誘発は

みられない(104)。さらに最近 間接誘発を引き起こすプラスミド

DNA は EcoRI 5' 断片であることが示された(105)。これらの

結果を合わせ考えると どうやら間接誘発は ccd 領域に付て

誘導された現象であって UV 照射に付て導入されたプラスミドが

複製できない時に ccd 機構が働くためではないかと想像

される。Hfr 株で間接誘発が起らないのは 染色体に組み

込まれた F プラスミドの ccdA に付て抑制効果に付て考えれば

うまく説明できる。もし この考えが正しいならば UV 照射 そのものは

必要条件ではなく プラスミドの複製が阻害されればよいことになる。

この仮説を検証するため ccd 領域をもつ pXX333 (図26) を入浴原菌

に入れ、高温に移してやると予想したように入ファージの誘発がみられた。

一方 ccd 領域をもたない ベクタープラスミド pHSG415 では このように

誘発は 起こらなかった。pXX333 による入ファージの誘発がかなり

始まる時間は pXX333 の コピー数が減少し 生菌数の増加が

抑えられる始まる時間と一致している。また pXX333 による入ファージ

の誘発は ccd A をもつ pXX339 (図23) によって抑えられるが、

ccd 領域をもたない pXX256 (図28) では 抑えられないことも明らか

となった。どうやら間接誘発は、これまで述べてきた ccd 領域の

働きによることは、まずまちがいないであろう。現在この点をさらに

確認し、その機構を明らかにするための実験を進めている。

第3節 今後の展望

Fプラスミドの安定保持には、複製機構の他に分配機構と細胞分裂共役機構が働いていることが明らかとなり、それぞれの機構を司る領域を同定することができた。今後さらに遺伝生化学的解析を進め、これらの機構を分子レベルで解明することが必要である。

分配機構については、プラスミド側の遺伝子は本論文で述べた3つの遺伝子 sopA、sopB および sopC が必要十分であると考えられ、HaeII-SalI (46.4-49.4 kb) 領域内に第4の遺伝子が存在する可能性は少ないように思える。そこで次の問題として、この機構に関与している宿主側の遺伝子および遺伝子産物を同定することが重要であろう。少なくともすでに述べたように sopB タンパク質と、いっしょに sopC 領域に結合する2つのタンパク質 (75kdと33kd) の関与が示唆されているので、これらのタンパク質をコードする遺伝子を探すことが必要であろう。Fプラスミドを安定に保持できない変異株がいくつか報告されており、その大部分はFプラスミドの複製に関与しているものと考えられている (52, 61, 106-112)。しかし、これらの変異株についての解析は、まだ十分には行われておらず、これらの中に複製そのものの

ではなく、分配機構に關与する遺伝子の変異株が含まれているかも知れない。ここで報告したミニFの分配に必須な領域を持つ oric プラスミドを使えば、これらの変異が複製機構に欠損を持つのか、あるいは、そうではなくて分配機構に欠損を持つのかを区別することが可能であろう。これらの解析は、ミニFの分配機構を解明する上で重要な手がかりとなるであろう。

生化学的アプローチとしては、上に述べた sopB タンパク質や宿主側の2つのタンパク質の sopC への結合を解析することが急務であろう。このとき sopA タンパク質の役割を併せて検討すべきであることはすでに述べたとおりである。これらの解析から分配機構の素反応が明らかにされるものと期待され、この方向での解析を計画している。しかし、プラスミドの分配という現象は、あくまで細胞分裂との関係において初めて、その本来の意味をもつ現象であるので、その全貌を明らかにするのは容易ではないだろうと思われる。

また、ミニFプラスミド以外のプラスミドの分配機構を解析し、プラスミド間での分配機構の共通点や相違点を比較検討することも可能な段階に

なっている。序論で述べたように いくつかのプラスミドにおいては 分配機構を司ると思われる領域の位置はすでにわかっているので ミニFやpSC101で用いたと同様の解析方法を用いれば これらのプラスミドの分配機構に関与する遺伝子を容易に同定できるであろう。これに関連して大腸菌ではいいが 酵母菌の2 μ m DNAプラスミドの安定保持には、プラスミドがコードする2種のタンパク質と1つのツスに働くDNA領域が関与しておりこのツスに働く領域には62~63bpの塩基配列が6.5回くり返し構造を成しているという報告がある(113)。ミニFの分配機構と極めて類似している興味深い。

一方、プラスミドとは別に細菌の染色体そのものも分配機構を持っているものと想像されるが 少なくともこれらで分離された oric プラスミドは安定に保持されているので oric の近傍に分配機構を司る領域がある可能性は少ない。たとえばミニFの sopC (incD) 領域について見られたように ツスに働く領域が不適合性を示すために oric プラスミド上に分配機構を司る領域があっても 宿主染色体上のこの領域との不適合性により oric プラスミドは安定に保持されないという

可能性も否定できない。ミニFの分配機構に関与していると思われる

2つの宿主タンパク質は染色体自身の分配機構にも関与している可能性

は十分に考えられるので、これらのタンパク質が特異的に結合する

染色体DNA領域があれば、これがミニFの sopC 領域に相当する

役割を持つかもしれない。いずれにせよ染色体の分配機構を解析

すること、今後の重要な課題の1つである。プラスミドは染色体を

起源として生じたのではないかという考えもあり(114)、複製機構と

ともに分配機構についても、プラスミドと染色体の間での共通性と

特異性を比較検討することは、進化的にも興味深い問題

である。

細胞分裂共役機構については、ccdA 活性と ccdB 活性の

調節がどのようにして行われているのかという点を解明することが急務

である。すでに述べたように ccdA のコピー数が活性調節に働

いていると考えられるが、このモデルの真偽を含めて ccdA が letA

遺伝子そのものであるのか、あるいは letA に近接してコピー数によって

活性の変わる領域が存在するのかといった問題や、その活性を

変化させるコピー数はいくつなのかという問題、さらには ccdA 活性が
いかにして ccdB 活性を 不活化するのかといった重要な問題については
今のところ推測の域を出ない。現在これらの問題を解明するための
実験を進めている。

Fプラスミドの複製が温度感受性となり高温では複製が阻害され
プラスミドを失った細胞が 高頻度で出現するようになった変異株が
いくつか報告されているが(6, 17, 106, 110, 115-117), これらの変異株はこれまで述べてきた
ccd 領域の働きを考えると少し疑問な点があるように思われる。

もし Fプラスミドの複製が高温で阻害されると 結果としてコピー数は
細胞分裂に伴って減少する。おそらく1回おしレ2回の分裂後には
コピー数は細胞当たり1コピーとなるに違いない。そうすれば ccd 領域
の働きによって細胞分裂は阻害され プラスミドを失った細胞の出現は
抑えられることになる。つまり序論において述べたような プラスミドの複製能
の欠損による プラスミドの脱落(図3)は ccd 領域を持つ Fプラスミドの
場合には 成り立たないことになるのである。ところが実際にそのような
性質を示す変異株が分離されている。この一見矛盾する事実は、

どう説明したら良いのか？ 次のような可能性が考えられるのでは
ないだろうか。 まずこれらの変異株を分離した選択方法に問題が
あると言わざるを得ない。つまりこれらの変異株の分離が行われた
当時は ccd 領域などについてはわかっていなかったもので、まったく
序論で述べた仮定(図3)が正しいと信じられていたために、まず
高頻度で脱落が起るような変異株を分離し、その後でその変異株
の複製能について検討したと考えられる。しかもこのような表現型を
示す変異株は、容易には分離できず、ニトロソグアニジンで強く
処理してやっと少数の変異株が分離できたと報告されている(6,117)。
ここでニトロソグアニジンは近接したDNA領域内に複数の変異を
起こしやすい、突然変異源である点に注意したい。またすでに述べたように
Fプラスミドの複製に必須な領域と ccd 領域は極めて近接して
いる。これらの知見から推定して、これまで報告されているFプラスミドの
複製変異株は、少なくとも複製能だけに変異を起こしているのでは
ないのではないかと。おそらく ccd 領域内の ccdB 遺伝子にも
変異が起っているのではないかと考えられる。ccdB 遺伝子が不活性に

ないが複製が阻害され コピー数が減少してもやはり細胞分裂

阻害は起らず プラスミドの脱落が起るに違いない。あるいは

ccd 領域に変異が起らなくても 分配機構が不活性となる

変異が起れば プラスミドの脱落が起るだろう。このような観点

から 複製変異株として 報告されているこれらの変異プラスミドに

ついては 再検討をすべきではないかということも ここで提言しておく。

ccd 機構についてのもう1つの重要な問題は SOS 反応との関係で

ある。SOS 反応は DNA 分子に生じた緊急事態に対処して細胞が

行う一連の複雑な反応で 大腸菌では関与する多数の遺伝子が

同定されてきている。しかし その複雑さからまだまだ不明な点が多く

今後の進展が期待されているテーマの1つである。原核細胞のみ

ならず 真核細胞においても SOS 反応が存在することがわかり始め

分化や発癌との関係も示唆されている現在、SOS 反応の分子機構を

解明することは極めて重要である。この意味において プラスミドが

この機構に関与している可能性が示されたことの意義は少くない。

特に プラスミドの特定の遺伝子が この反応を誘導する引き金の1つとして

働くことと、その遺伝子の活性化が宿主染色体DNAに直接損傷

などを与えない状況下で引き起こされるという点は注目に値する。

今後、この系を用いての解析は、SOS反応の解明にとって重要な

知見をもたらすものと期待される。これに関連して ccd 領域を持つ

プラスミドによる増殖阻害を受けなくなった変異株が分離されている

(第3章 第2節) ので、この変異が SOS 反応に関与することが

わかっている既知の遺伝子に起こったものかどうかの検討を含めて

ccd 機構に関与する宿主側の遺伝子を同定解析する方向も考え

いる。

さらに他のプラスミドについては、Rms 201 プラスミドで安定保持に

関与する領域が2つあることが示されており(13)、1つは分配機構

を司るものと思われるが、もう1つの領域は MinP の ccd 領域に相当

するのではないかと、可能性も考えられる。このことは他のプラスミド

でも分配機構の他に細胞分裂共役機構を持っている可能性を

示唆している。また、プラスミドにとどまらず宿主染色体についても

検討してみることが必要であろう。

プラスミドの安定保持機構の解析から単にプラスミドの問題
にとどまらず 宿主染色体の複製, 分配, 細胞分裂といった細胞自身の
増殖制御に関わる問題への展望も開けつつあり これらの問題に
対して 今後さらに遺伝生化学的解析を精力的に進めてゆくことが
重要であると考えている。

— 謝 辞 —

本論文を終えるにあたり、大学院課程において御指導、御助言下さった由良隆教授、平賀壮太先生に心から感謝致します。平賀壮太先生には実際の研究上、共同研究者としても有益な御助言をいただきました。また初期の研究は三木徹博士(現、山口大)と共同で行ったものであり、現在は森浩禎氏と共同で行っていることを明記し、こちらの方々にも深く感謝致します。

大森治夫博士にはDNAとゲルの操作技術について、和田千恵子氏にはプラスミドの取り扱いについて、そして永田俊夫先生には菌株の選定等について多くの助言をいただきました。ここに感謝の意を表します。次の方々には菌株やプラスミド株をお送りいただきましたので列記し、お礼申し上げます；松原謙一先生(阪大)、三木健良先生(九大)、山口和夫先生(金沢大)、広瀬進博士(基生研)、Hashimoto-Gotoh博士(マックス=プランク研究所)。

また次の方々には貴重な研究成果を公表前にお教え
いただきましたので、これらの方々にも併せてお礼申し
上げます; 松原謙一先生, 三木健良先生, 早川
安彦博士(阪大)。田中正史氏, 木村穰博士
(現. 慶応大)には有意義な議論をしていただきま
した。感謝致します。

最後に 以上の方々の他に 実験を手伝って下さった
方々も 本論文をまとめる作業を手伝って下さった方々
に厚くお礼申し上げますとともに, 色々お世話になっ
た遺伝部, 化学部の皆様に感謝の意を表します。

参考文献

1. 松原謙一 (1976) フォズミド (講談社サイエンティフィク).
2. 松原謙一 (1982) 蛋白質核酸酵素 27, 97
3. Sharp, P. A., Hsu, M-T., Ohtsubo, E. & Davidson, N. (1972) J. Mol. Biol. 71, 471.
4. Timmis, K., Cabello, F. & Cohen, S. N. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 2242.
5. Lovett, M. A. & Helinski, D. R. (1976) J. Bacteriol. 127, 982.
6. Jacob, F., Brenner, S. & Cuzin, F. (1963) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28, 329.
7. Nordström, K., Molin, S. & Aagaard-Hansen, H. (1980) Plasmid 4, 215.
8. Miki, T., Easton, A. M. & Rownd, R. H. (1980) J. Bacteriol. 141, 87.
9. Novick, R., Wyman, L., Bouanchaud, D. & Murphy, E. (1975) in "Microbiology-1974" (D. Schlessinger, ed.) p. 115.
10. Kool, A. J. & Nijkamp, N. J. J. (1974) J. Bacteriol. 120, 569.
11. Ike, Y., Hashimoto, H. & Mitsuhashi, S. (1981) J. Bacteriol. 148, 534.
12. Durkacz, B. W. & Sherratt, D. J. (1973) Mol. Gen. Genet. 121, 71.
13. Ike, Y., Hashimoto, H. & Mitsuhashi, S. (1981) J. Bacteriol. 147, 578.
14. Murotsu, T., Matsubara, K., Sugisaki, H. & Takanami, M. (1981) Gene 15, 257.
15. Ogura, T. & Hiraga, S. (1982) Cell (in press)

16. Figurski, D., Kolter, R., Meyer, R., Kahn, M., Eichenlaub, R. & Helinski, D. R. (1978) in "Microbiology-1978" (D. Schlesinger, ed.) p. 105.
17. Gardner, R. C., Caughey, P. C., Lane, D. & Bergquist, P. L. (1980) *Plasmid* 3, 179.
18. Seelke, R., Kline, B., Trawick, J. & Ritts, G. (1982) *Plasmid* 7, 163.
19. Bergquist, P. L., Downard, R. A., Caughey, P. A., Gardner, R. C. & Lane, H. E. D. (1981) *J. Bacteriol.* 147, 888.
20. Manis, J. J. & Kline, B. C. (1978) *Plasmid* 1, 492.
21. Kahn, M. L., Figurski, D., Ito, L. & Helinski, D. R. (1979) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 43, 99.
22. Tolun, A. & Helinski, D. R. (1981) *Cell* 24, 687
23. 筒井元, 松原謙一 (準備中)
24. Kline, B. & Palchaudhuri, S. (1980) *Plasmid* 4, 281.
25. 松原謙一 (1982) 第1回ウイルス研究所コロキウム抄録 p.5.
26. Tolun, A. & Helinski, D. R. (1982) *Mol. Gen. Genet.* 186, 372.
27. Lane, H. E. D. (1981) *Plasmid* 5, 100.
28. Yasuda, S. & Hirota, Y. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5458.
29. Miki, T., Hiraga, S., Nagata, T. & Yura, T. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 5099.
30. von Meyenburg, K., Hansen, F. G., Nielsen, L. D. & Riise, E. (1978) *Mol. Gen. Genet.* 160, 287.
31. Messer, W., Bergmans, H. E. N., Meijer, M., Womack, J. E., Hansen, F. G. & von Meyenburg, K. (1978) *Mol. Gen. Genet.* 162, 269.

32. von Meyenburg, K., Hansen, F. G., Riise, E., Bergmans, H. E. N., Meijer, M. & Messer, W. (1978) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43, 121.
33. Ogura, T., Miki, T. & Hiraga, S. (1980) 77, 3993.
34. Meacock, P. A. & Cohen, S. N. (1980) Cell 20, 529.
35. Helmstetter, C. E., Cooper, S., Pierucci, O. & Revelas, E. (1968) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33, 809.
36. Zeuthen, J. & Pato, M. L. (1971) Mol. Gen. Genet. 111, 242.
37. Cooper, S. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2706.
38. Davis, D. B. & Helmstetter, C. E. (1973) J. Bacteriol. 114, 294.
39. Collins, J. & Pritchard, R. H. (1973) J. Mol. Biol. 78, 143.
40. Abe, M. (1974) Mol. Gen. Genet. 131, 63.
41. Terawki, Y., Rownd, R. & Nakaya, R. (1974) J. Bacteriol. 117, 687.
42. Pritchard, R. H., Chandler, M. G. & Collins, J. (1975) Mol. Gen. Genet. 138, 143.
43. Gustafsson, P. & Nordström, K. (1975) J. Bacteriol. 123, 443.
44. Rownd, R. H., Perlman, D., Womble, D. D., Taylor, D. P., Morris, C. F. & Hill, W. E. (1975) in "Microbial drug resistance" (S. Mitsuhashi & H. Hashimoto, ed.) p. 27.
45. Gustafsson, P., Nordström, K. & Perran, J. (1978) Plasmid 1, 187.
46. Andresdottir, V. & Masters, M. (1978) Mol. Gen. Genet. 163, 205.
47. Steinberg, D. & Helmstetter, C. E. (1981) Plasmid 6, 342.
48. Leonard, A. C., Hucul, J. A. & Helmstetter, C. E. (1982)

- J. Bacteriol. 149, 499.
49. Terawaki, Y., Takayasu, H. & Akiba, T. (1967) J. Bacteriol. 94, 687.
50. DiJoseph, C. G. & Kaji, A. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 2515.
51. Koyama, A. H. & Yura, T. (1975) J. Bacteriol. 122, 80.
52. Wada, C. & Yura, T. (1979) J. Bacteriol. 140, 864.
53. 三木健良, 堀内忠郎 (1970) 遺伝学雑誌 45, 482.
54. Yamamoto, T., Finver, S., Yokota, T., Bricher, J. & Kaji, A. (1981) J. Bacteriol. 146, 85.
55. 三木健良, 大末和広, 角真一郎, 崎元和範, 堀内忠郎 (1979) 第2回分子生物学会年会 (福岡).
56. Ogura, T. & Hiraga, S. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA (投稿中)
57. 善岡克次, 野見山尚之, 長浜哲世子, 三木健良, 神佳之, 高木康敬, 堀内忠郎 (1981) 第4回分子生物学会年会 (金沢)
58. 三木健良, 善岡克次, 工藤直子, 奥本智子, 張榮昌, 堀内忠郎 (1982) 第1回ウイルス研究所コロキウム抄録 p. 7
59. 小椋光, 平賀壮太 (1982) 第1回ウイルス研究所コロキウム抄録 p. 7
60. Miki, T. (1978) Ann. Rep. Inst. Virus Res., Kyoto Univ. 21, 1.
61. Wada, C., Hiraga, S. & Yura, T. (1976) J. Mol. Biol. 108, 25.
62. Tsutsui, H. & Matsubara, K. (1981) J. Bacteriol. 147, 509.
63. Monk, M. & Kinross, J. (1972) J. Bacteriol. 109, 971.
64. Wood, W. B. (1966) J. Mol. Biol. 16, 118.
65. Bachmann, B. J. & Low, K. B. (1980) Microbiol. Rev. 44, 1.
66. Bolivar, F., Rodoriguez, R. L., Greene, P. J., Betlach, M. C., Heynecker, H. L., Boyer, H. W., Crosa, J. H. & Falkow, S.

- (1977) *Gene* 2, 95.
67. Hashimoto-Gotoh, T., Franklin, F. C. H., Nordheim, A. & Timmis, K. N. (1981) *Gene* 16, 227
 68. Lennox, E. S. (1955) *Virology* 1, 190.
 69. Vogel, H. J. & Bonner, D. M. (1956) *J. Biol. Chem.* 218, 97.
 70. Meyers, J. A., Sanchez, D., Elwell, L. P. & Falkow, S. (1976) *J. Bacteriol.* 127, 1529.
 71. Clewell, D. B. & Helinski, D. R. (1969) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 62, 1159.
 72. Klein, R. D., Selsing, E. & Wells, R. D. (1980) *Plasmid* 3, 88.
 73. Ish-Horowicz, D. & Burke, J. F. (1981) *Nucleic Acids Res.* 9, 2989.
 74. Cameron, J. R., Panasenko, S. M., Lehmann, I. R. & Davis, R. W. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 3416.
 75. Womble, D. D., Taylor, D. P. & Rownd, R. H. (1977) *J. Bacteriol.* 130, 148.
 76. O'Callaghan, C. H., Morris, A., Kirby, S. M. & Shingler, A. H. (1972) *Antimicrob. Agents Chemother.* 1, 283.
 77. Hirose, S. (未発表)
 78. Uhlin, B. E. & Nordström, K. (1977) *Plasmid* 1, 1.
 79. Kline, B. C. & Lane, D. (1980) *Plasmid* 4, 231.
 80. Komai, N., Nishizawa, T., Hayakawa, Y., Murotsu, T. & Matsu-
bara, K. (1982) *Mol. Gen. Genet.* 186, 193.
 81. Gross, J. D., Grunstein, J. & Witkin, E. M. (1971) *J. Mol. Biol.* 58, 631.
 82. Horiuchi, T. & Nagata, T. (1973) *Mol. Gen. Genet.* 123, 89.
 83. Witkin, E. M. (1976) *Bacteriol. Rev.* 40, 869.

84. Wehlmann, H. & Eichenlaub, R. (1980) Mol. Gen. Genet. 180, 205.
85. Eichenlaub, R., Figurski, D. & Helinski, D. R. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 1138.
86. Ebbers, J. & Eichenlaub, R. (1981) J. Bacteriol. 147, 736.
87. 早川安彦 (未発表)
88. 工藤直子, 善岡克次, 三木健良, 堀内忠郎 (1981) 第4回分子生物学会年会 (金沢).
89. 早川安彦, 松原謙一 (私信)
90. Novick, R., Sanchez-Rivas, C., Gruss, A. & Edelman, I. (1981) Plasmid 3, 348.
91. Hohn, B. & Korn, D. (1969) J. Mol. Biol. 45, 385.
92. Cuzin, F. & Jacob, F. (1965) C. R. Acad. Sci. Paris 260, 5411.
93. 山口和夫 (私信)
94. Novick, R. P. & Hoppensteadt, F. C. (1978) Plasmid 1, 421.
95. Timmis, K. N. (1979) in "Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance (K. N. Timmis & A. Pühler, ed.) p. 13.
96. Nordström, K., Molin, S. & Aagaard-Hansen, H. (1980) Plasmid 4, 332.
97. Hiraga, S. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 198.
98. 小椋光, 平賀壮太 (1982) 蛋白質核酸酵素 27, 9.
99. 三木健良, 堀内忠郎 (1971) 遺伝学雑誌 46, 426.
100. 大末和広, 三木健良, 崎元和範, 堀内忠郎 (1976) 遺伝学雑誌 51, 433.
101. 崎元和範, 三木健良, 堀内忠郎 (1978) 遺伝学雑誌 53, 446.
102. 三木健良, 崎元和範, 原智子, 堀内忠郎 (1980) 第3回分子生物学会年会 (京都).
103. Borek, E. & Ryan, A. (1958) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 44, 374.

104. Rosner, J. L., Kass, L. R. & Yarmolinsky, M. B. (1968) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33, 785.
105. Moreau, P. L., Pelico, J. V. & Devoret, R. (1982) Mol. Gen. Genet. 186, 170.
106. Cuzin, F. & Jacob, F. (1967) Ann. Inst. Pasteur (Paris) 112, 397.
107. Yamagata, H. & Uchida, H. (1972) J. Mol. Biol. 63, 281.
108. Yamagata, H. & Uchida, H. (1972) J. Mol. Biol. 67, 533.
109. Stadler, J. & Adelberg, E. A. (1972) J. Bacteriol. 109, 447.
110. Hathaway, B. G. & Bergquist, P. L. (1973) Mol. Gen. Genet. 127, 297.
111. Jamieson, A. F. & Bergquist, P. L. (1976) Mol. Gen. Genet. 148, 221.
112. Jamieson, A. F. & Bergquist, P. L. (1977) Mol. Gen. Genet. 150, 171.
113. 菊池淑子 (1982) 第1回ウイルス研究所コロキウム抄録 p.18.
114. 平賀壮太 (1976) 科学 46, 730.
115. Cuzin, F. & Jacob, F. (1965) C. R. Acad. Sci. Paris 260, 2087.
116. Eichenlaub, R. (1979) J. Bacteriol. 138, 559.
117. Bergquist, P. L., Jamieson, A. F., Gardner, R. C. & Lane, D. (1980) Plasmid 3, 167.

表1. ランダムに分配されるプラスミドの安定性。

n value ^a	Plasmid-carrying fraction after 27 generations ^b	
	Model 1	Model 2
1	0.00043	0.0036
2	0.175	0.166
3	0.656	0.569
4	0.906	0.842
5	0.975	0.950
6	0.993	0.985
7	0.9984	0.9957
8	0.9995	0.9987
9	0.9999	0.9996
10	1.0000	0.9999

^a 1世代当りのプラスミドの平均複製回数(文献7より転載)

^b 実験開始時(0世代)にプラスミドを持つ細胞の割合を1として, 27世代後にプラスミドを持っている細胞の割合を示す。Model 1とModel 2はプラスミドの複製制御機構についてこの2つの可能性を示す(本文参照)。

表2. 使用した大腸菌株。

この表は“材料と方法”(p.25)に挿入
されている。

表3. oriC プラスミドのコピー数。

Plasmid	Copy number ^a	Relative activity of β -lactamase ^b
pXX11	0.9	≈ 1.0
pNH05	1.6	1.9
pXX11-S2	3.0	3.4
pXX11-S21	2.9	2.7

^a プラスミドのコピー数は“材料と方法”に述べたようにして 0.5% グルコース, 0.2% カザミノ酸および 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の L-トリプトファンを加えた ME 培地中で [^3H] チミジンでパルス標識し, プラスミド分画に取り込まれた放射活性と染色体分画に取り込まれた放射活性から計算した。^b β -ラクタマーゼ活性は“材料と方法”に述べた方法で測定し, pXX11 を持つ菌の活性を 1.0 とし相対値で示した。 β -ラクタマーゼの活性は、プラスミドのコピー数にほぼ比例することが示されている(78)。

表4 プラスミドのコピー数。

Plasmid	Copy number ^a	Stability ^b
pSC138	0.9	Stable
pXX199	3.6	Stable
pXX279	2.8	Stable
pXX206	3.1	Unstable
pXX230	4.0	Unstable
pXX271	6.3	Unstable

^a プラスミドのコピー数は“材料と方法”に述べたようにして、培地中で³Hチミジンでパルス標識し、プラスミド分画に取り込まれた放射活性と染色体分画に取り込まれた放射活性から計算した。^b 図11に示した結果による。

表5 相補性解析の要約。

Exp.	pBR322- derivative ^a	<u>oriC</u> plasmid ^b	Effect observed ^c
1	pXX254	pXX199 (stable)	None
2	pXX254	pXX206 (unstable)	None
3	pXX254	pXX230 (unstable)	None
4	pXX167	pXX199 (stable)	Inhibition
5	pXX167	pXX206 (unstable)	Partial stabilization
6	pXX167	pXX253 (unstable)	Partial stabilization
7	pXX167	pXX230 (unstable)	None
8	pXX288	pXX199 (stable)	None
9	pXX288	pXX206 (unstable)	Stabilization
10	pXX288	pXX253 (unstable)	None
11	pXX288	pXX230 (unstable)	None

図13 A-C に示した相補性解析の結果を要約した。

^a Δ ニF断片を持つ pBR322 由来プラスミドの構造は図12に示した。 ^b oriC プラスミドの構造は図10に示した。

^c oriC プラスミドの安定性に及ぼす pBR322 由来プラスミドの効果を示す。

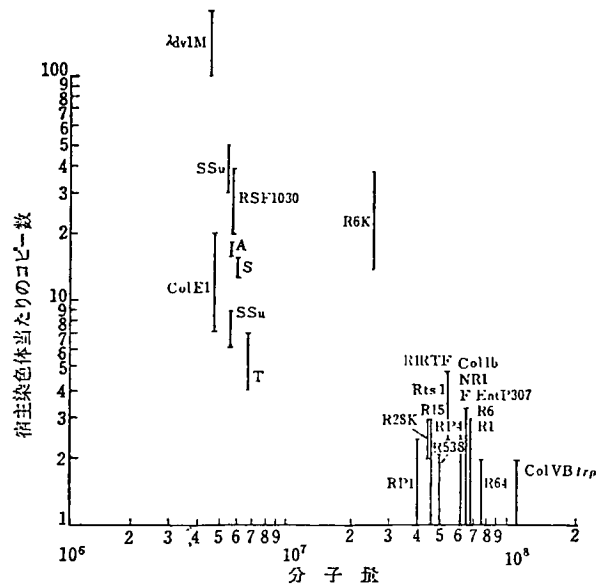


図1。プラスミドの分子量と宿主染色体当りのコピー数(文献1より転載)。
 種々のプラスミドの分子量(ダルトン)と宿主染色体当りのコピー数を示す。なお1×が
 ダルトン(MDal)は約1.5キロベース(kb)に相当する。

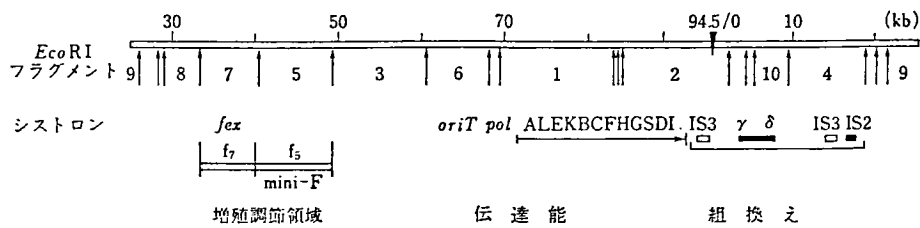


図2。F⁺プラスミドの遺伝子地図とEcoRIによる物理的地図(文献2より転載)。

F⁺プラスミドDNAの環状構造を開いた形で表現してある。キロベース(kb)はSharpら(3)によるF地図上の座標。EcoRI断片は大きい方から順にf₁, f₂...と命名されている(図中には数字のみ: 10以降は省略してある)。↑がEcoRI切断点。f₅とf₇はそれぞれ自律増殖できる。このうちf₅が本論文で述べるミニFプラスミドの持つ断片である。伝達能領域の右向き矢印は転写の方向を、*oriT*は接合伝達の際のDNA移動の起点を示す。組換え領域のIS, γ , δ 等は挿入配列。

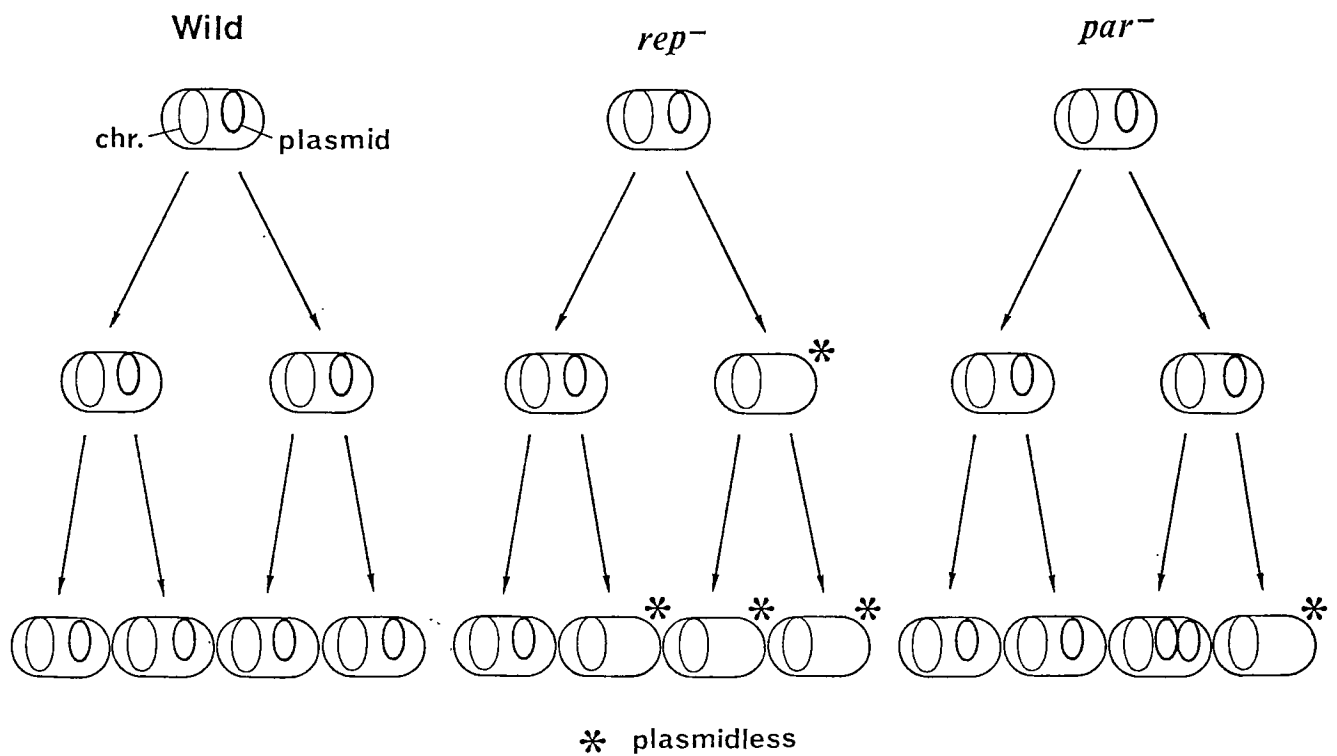


図3。プラスミドの複製と分配。

細胞分裂に伴ってプラスミドが娘細胞へ受け渡される様子を示す。横向き長の長円は細胞を表わし、細胞内の大きい楕円(細い線)は宿主染色体も、小さい楕円(太い線)はプラスミドを表わす。この図では便宜的に染色体とプラスミドのコピー数は1として示している。Wildは野生型のプラスミドの場合を、*rep*⁻は複製能欠損変異株のプラスミドの場合を、*par*⁻は分配能欠損変異株のプラスミドの場合を示す。星印の細胞はプラスミドを失った細胞を表わす。

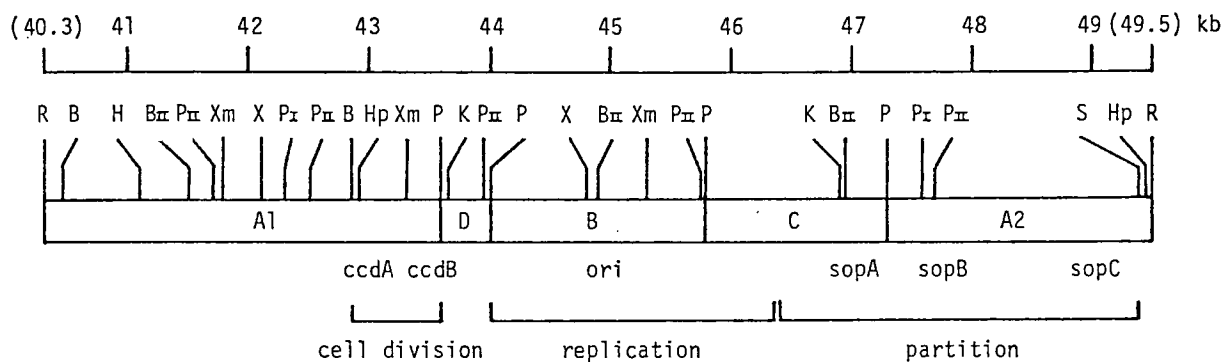


図4。Fプラスミドの *EcoRI* f5 断片の物理的および機能的地図(15)
 上に示した数字は Fケラムの kb座標を示す(3)。*Pst* I 断片断片は Murotsuら(14)に従って A1, D, B, C, および A2 と呼ばれる。制限酵素 *Bam*HI(B), *Bgl*II(BII), *Hind*III(H), *Hpa*I(Hp), *Kpn*I(K), *Pst*I(P), *Pvu*I(PI), *Pvu*II(PII), *Eco*RI(R), *Sal*I(S), *Xho*I(X), および *Xma*I(Xm)の切断点を示す。自律的複製に必要な領域は Murotsuら(14)による。*ori*は複製起点を示す。プラスミドの分配機構および細胞分裂共役機構に関する領域については本論文で述べる。

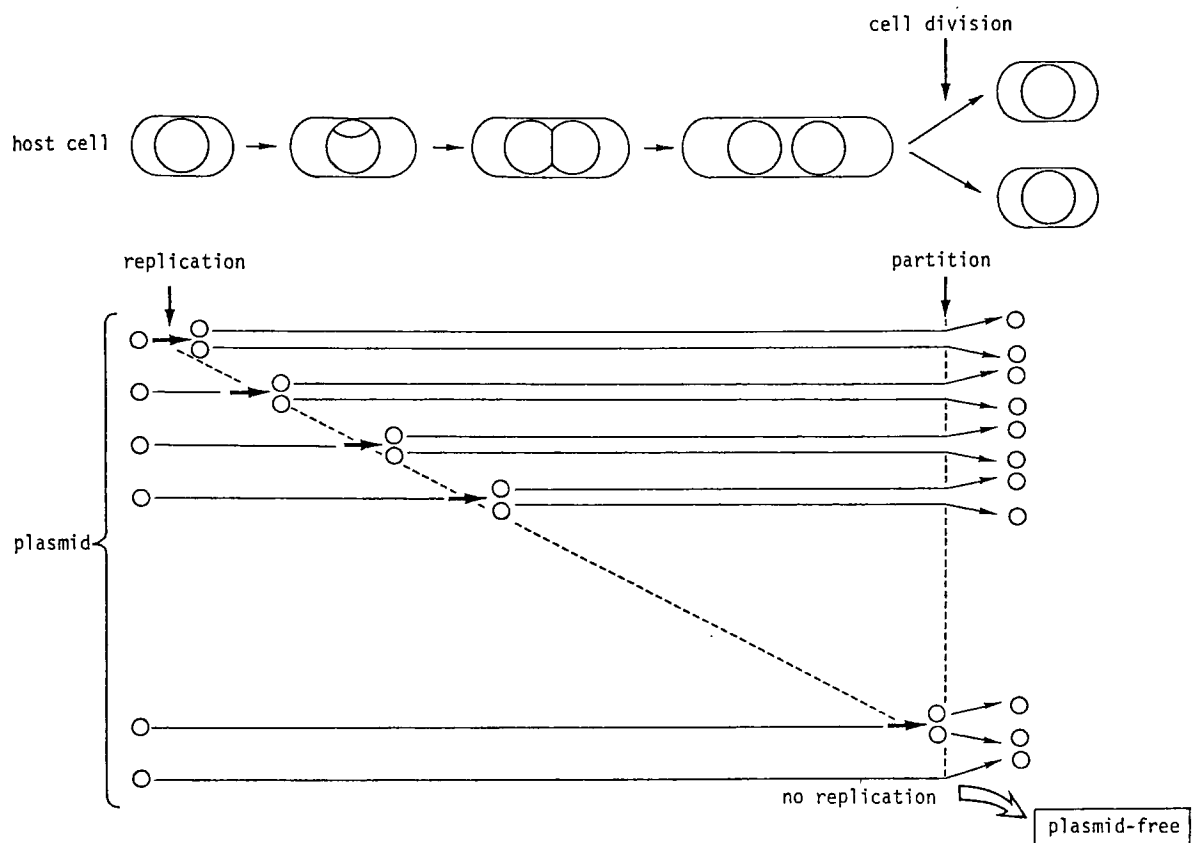


図5。細胞周期とプラスミドの複製時期。

プラスミド(小さい丸)の複製時期(太い矢印)が宿主細胞の分裂周期または染色体の複製周期と共役していない場合の個々の細胞におけるプラスミドの複製と分配の様子を示す。上に宿主細胞の分裂周期と染色体複製の様子を示す。一番下にプラスミドの複製が1世代の間に1回も起こらず、プラスミドを失った細胞が出現する場合の様子を示す。

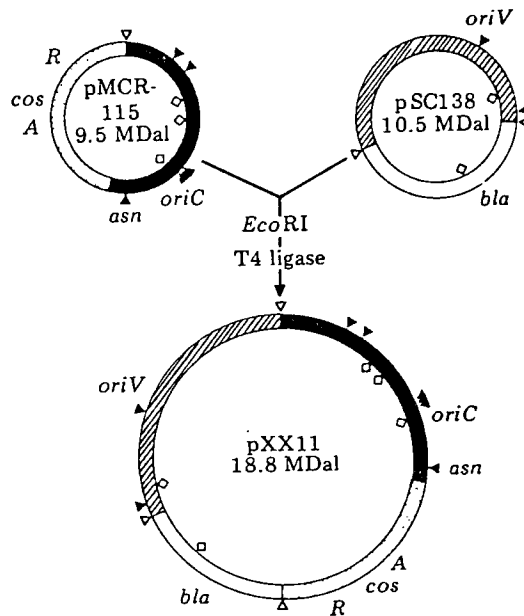


図6。pXX11の作製。

黒帯は大腸菌染色体由来のDNAを、点帯はファージ入のDNAを、斜線帯はシニFプラスミド由来のDNAを、そして白帯はアピロシリ耐性断片を表わす。pXX11は bla 遺伝子の近傍に1.2 MDal (≒1.8 kb) の欠失変異を持つ。遺伝子記号 cos はファージ入の付着末端を、A と R はファージ入の A および R 遺伝子を、asn は大腸菌の asn 遺伝子を、bla はアピロシリ耐性遺伝子を、oriC と oriV は大腸菌染色体とシニFプラスミドの複製起点を表わす。EcoRI (▽), HindIII (◇) および BamHI (▼) の切断点を示す。なお1 MDal は約1.5 kbに相当する。

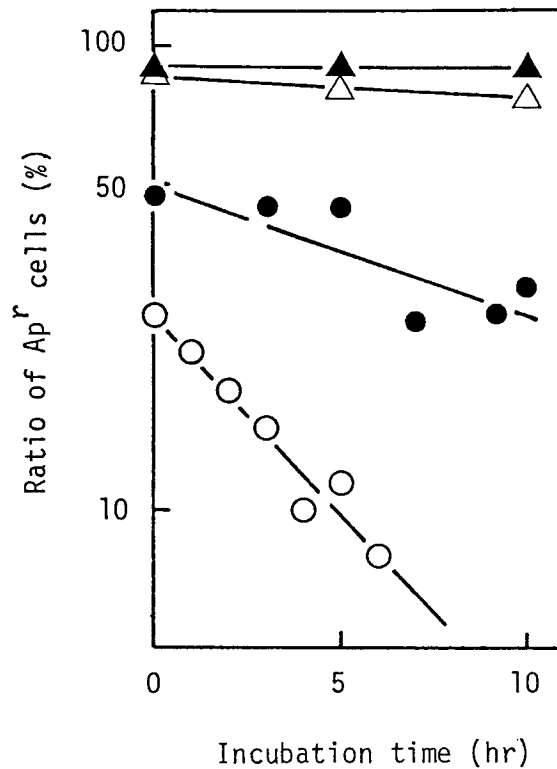


図7。oriCプラスミドの安定性。

oriCプラスミドを持つKY7341(Hfr recA1)株を非選択培地で増殖させ、"材料と方法"に述べた方法でプラスミドの安定性を調べた。プラスミドの存在はアンピシリン耐性($Ap^r=bla$)マーカーを使って調べた。それぞれのプラスミドを持つ株の増殖速度とプラスミドを持たない株の増殖速度との間には差は認められず、濁度で調べた世代時間はいずれも 33 ± 1 分であった(データは示さず)。●, pXX11 ○, pNH05 ▲, pXX11-S2 △, pXX11-S21。

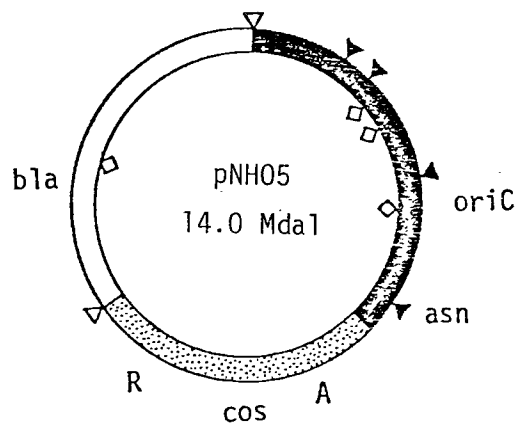


図8 . oriC プラスミド pNH05 の構造。

oriC プラスミド pMCR115 (図6) と pSC138 のアンピシリン耐性断片とから成る oriC プラスミド pNH05 の構造を示す。黒帯は 大腸菌 染色体由来の DNA を、点帯は ファージ λ の DNA を、白帯は アンピシリン耐性断片を表わす。遺伝子記号 および 制限酵素による切断点の記号は図6に同じ。

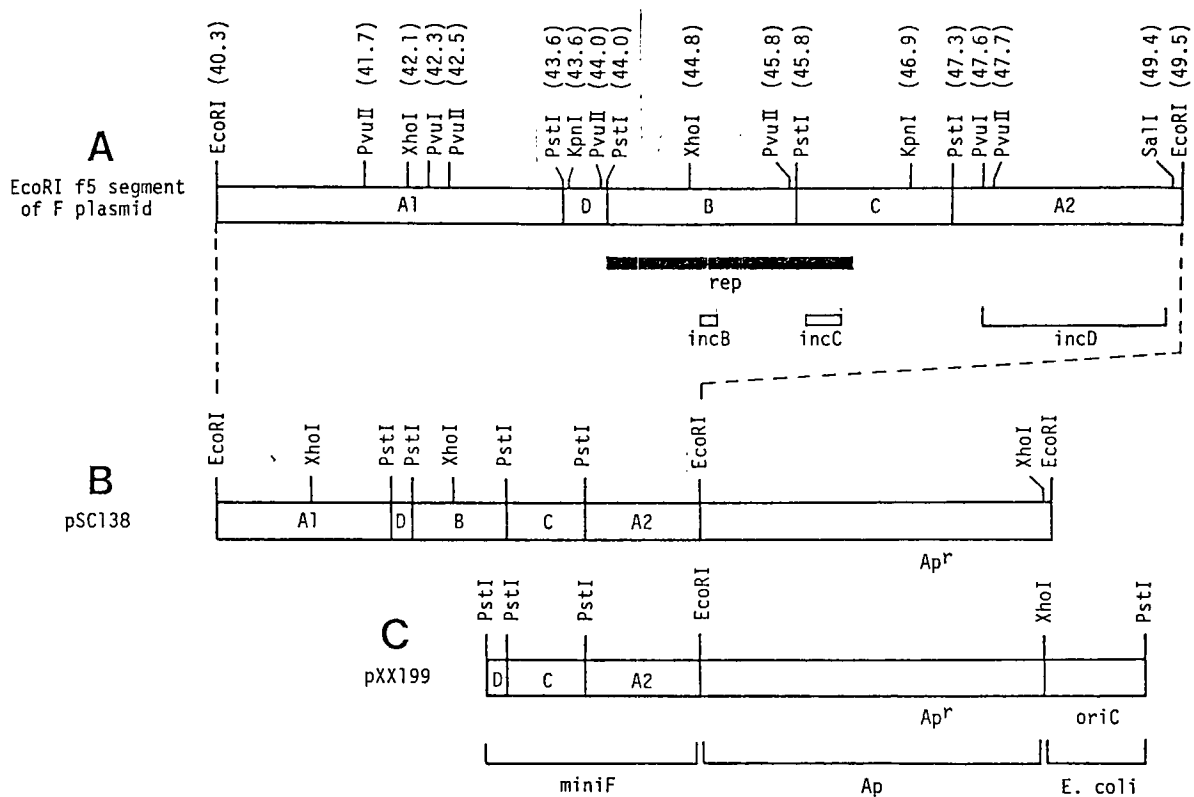


図9. ミニF pSC138 および 安定な oriC プラスミド pXX199の地図。

(A) Fプラスミドの EcoRI f5断片の物理的・機能的地図。本研究で用いた制限酵素の切断点を示す。カッコ内の数字はFゲノム上のKb座標(3)を表わす。断片の名称A1, D, B, C およびA2はMurotsuら(14)に従った。repは自律増殖に必要な最小領域(14)を表わす。incB, incC および incDはプラスミドの不和合性を司る領域を表わす(22,23,79)。(B) f5断片とアンピシリン耐性(Apr)断片から成るミニFプラスミドpSC138の構造。(C) pXX199の構造。このプラスミドはXhoI-PstI断片(E. coli)上の複製起点(oriC)を使って複製し、非選択的条件下で安定に保持される(本文参照)。

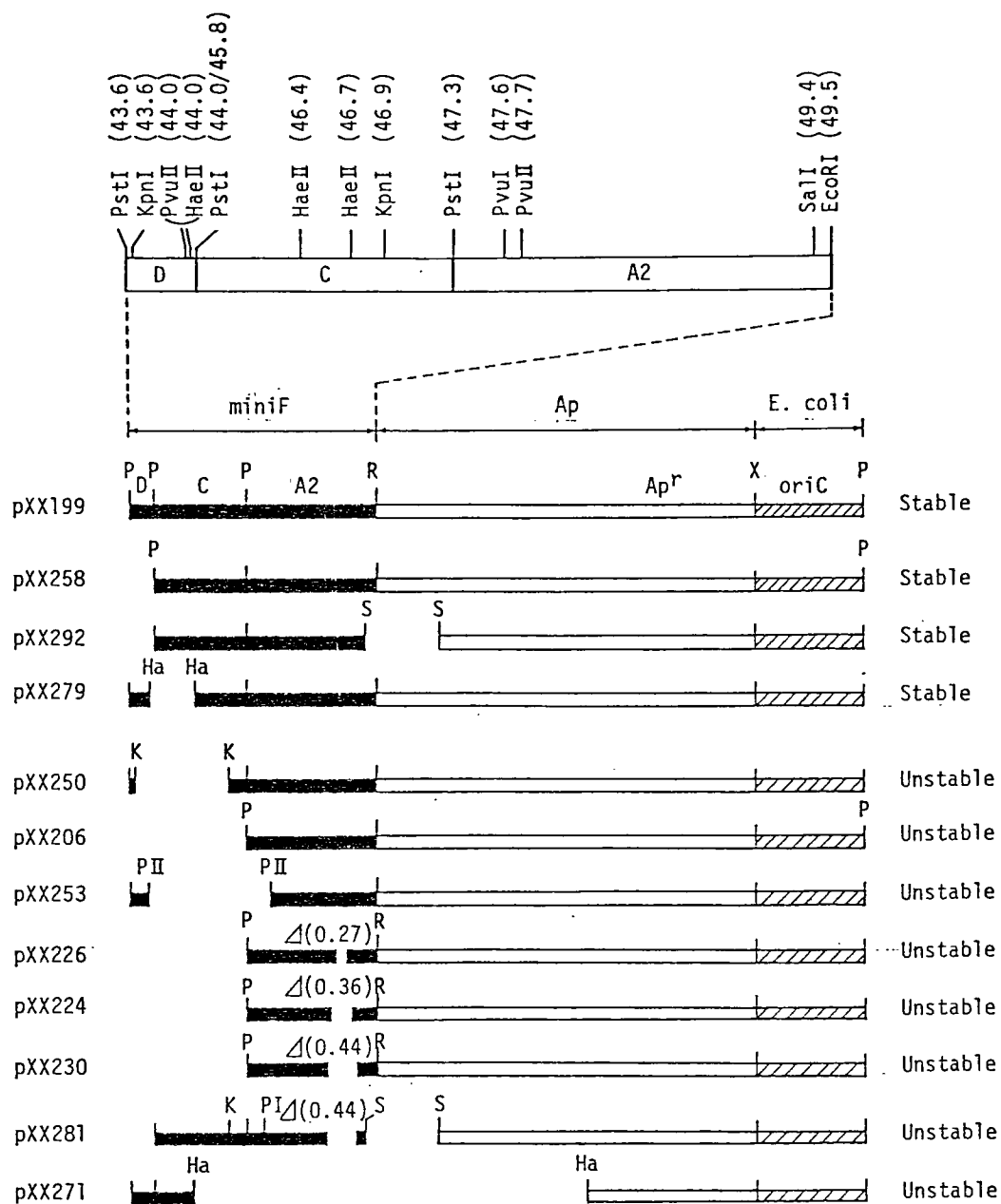


図10. *oriC* プラスミド pXX199 の欠失変異株の構造。

断片と遺伝子マーカーの名称は図9に同じである。*EcoRI*(R), *PstI*(P) および *XhoI*(X) の切断点を示した。欠失変異株を作製するために用いた制限酵素の切断点のみそれぞれのプラスミドの地図上に示した。制限酵素の記号は, S(*SalI*), Ha(*HaeII*), K(*KpnI*), PII(*PvuII*) および PI(*PvuI*) である。pXX279 を作製するために用いた *HaeII* 切断点は地図上の 44.0 kb と 46.4 kb である。また pXX271 を作製するために用いた *HaeII* 切断点の1つは 46.4 kb である。*oriC* プラスミド pXX206, pXX224 および pXX230 は *oriC* プラスミドの *EcoRI*-*PstI* 断片と pXX154, pXX179 および pXX157 (図17) の *A₂* 断片を結合して作製した。△は自然欠失変異を表わし、カッコの中の数字は欠失の大きさを kb で表わす。これらのプラスミドの非選択培地での安定性を右側に示す(データは図11)。

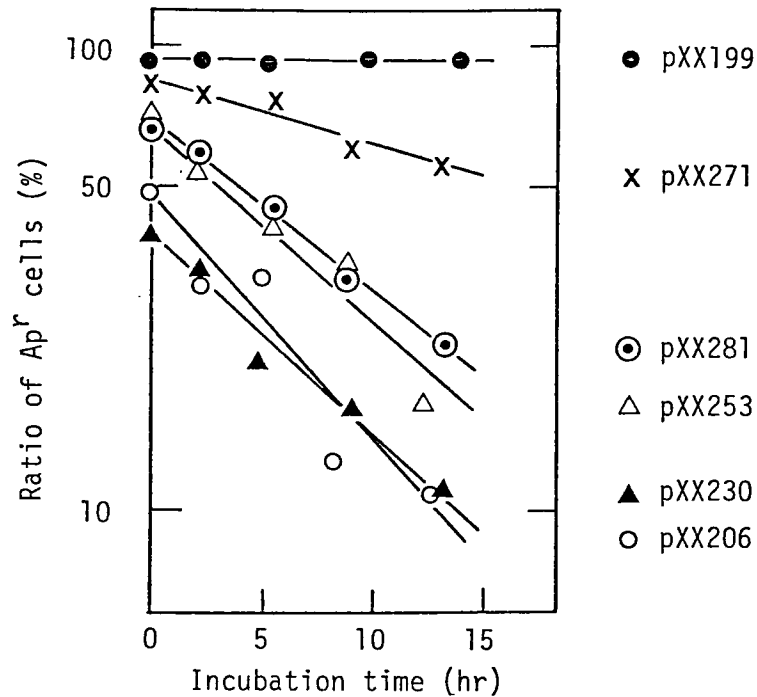


図 11. oriC フラスミド pXX199 由来 フラスミドの安定性。

種々の フラスミドを持つ KY7231 株を非選択培地で増殖させ、“材料と方法”に述べた方法で フラスミドの安定性を調べた。フラスミドの存在はアンピシリン耐性 (Apt^r) マーカーを使って調べた。それぞれのフラスミドを持つ株の増殖速度とフラスミドを持たない株の増殖速度との間には差は認められず、温度で調べた世代時間はいずれも 40-42 分であった。(データは示さず)。それぞれのフラスミドの記号を右側に示す。pXX292, pXX258 および pXX299 についてのデータは示していないが、pXX199 と同様安定であった。

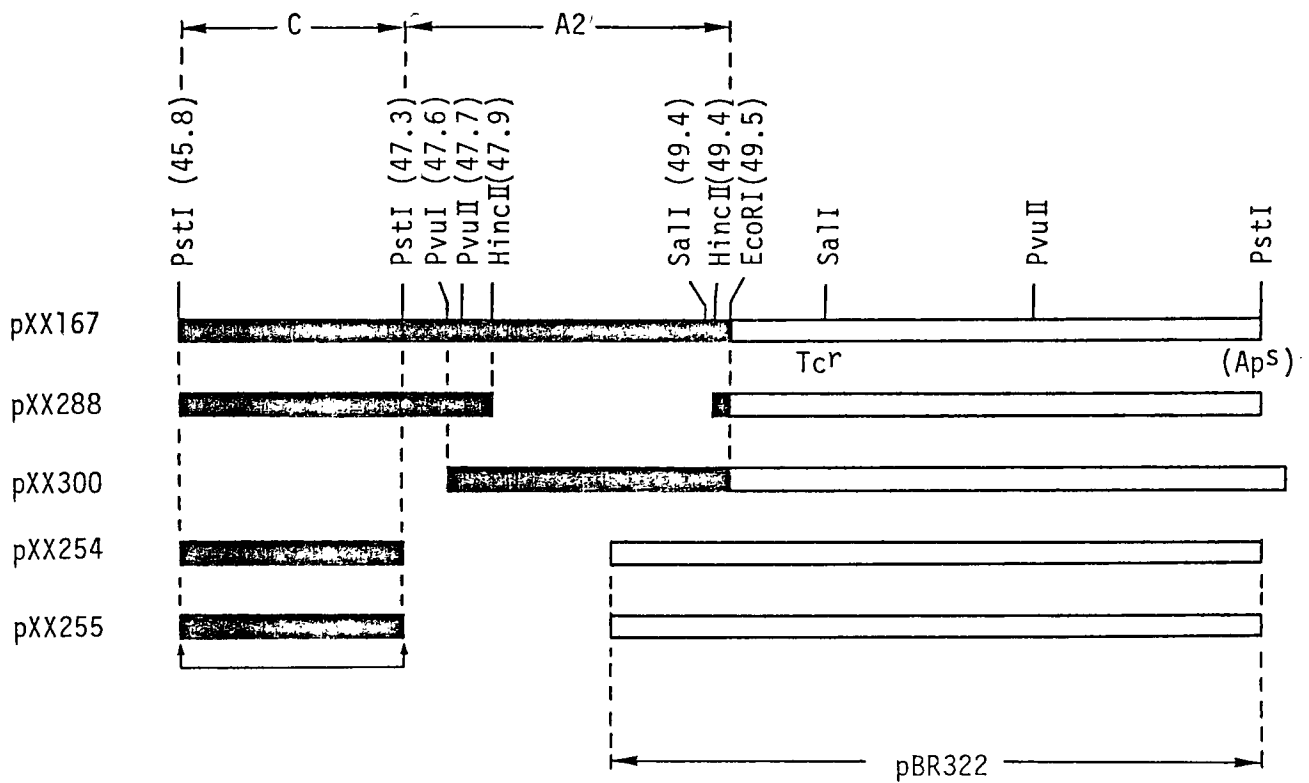


図12。ミニF C-A2 断片の種々の領域を持つpBR 322 由来プラスミドの構造。

C-A2 断片全体を持つpXX167は ミニF(f5)断片とpBR322から成るpKP1033(図17)をPstIで切断して作製した。数種の制限酵素の切断点をpXX167の地図上に示す。黒帯と白帯は、それぞれFプラスミドのC-A2断片およびpBR322のケツムを表わす。↗↘は断片が逆向きにpBR322に挿入されていることを示す。

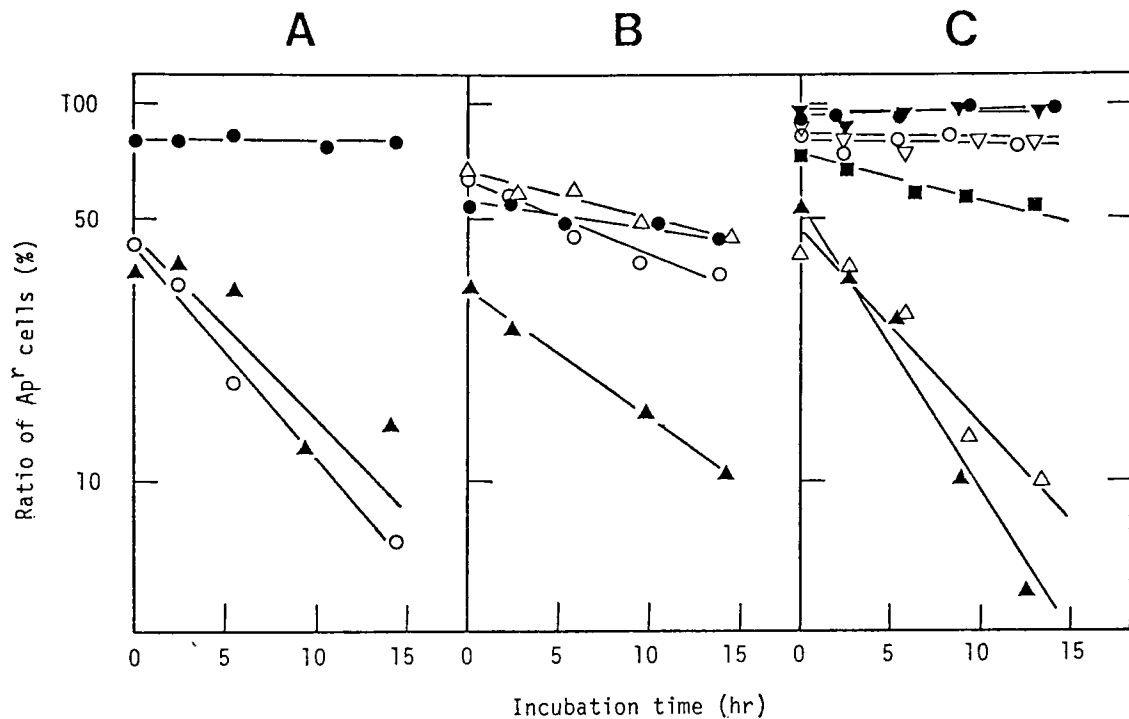


図13。ミニFプラスミドの種々の断片を持つ pBR322 由来プラスミド 共存下での oriC プラスミドの安定性。

pBR322 由来の pXX254(A), pXX167(B) または pXX288(C) 共存下での oriC プラスミドの安定性を KY7231 株を用いて調べた。アピシリン非存在下の増殖中 アピシリン耐性細胞の比率を“材料と方法”に述べた方法で調べた。濁度で調べた世代時間はすべて 40-42 分であった。●, pXX199 ○, pXX206 ▲, pXX230 △, pXX253 ▼, pXX250 ▽, pXX226 ■, pXX224。

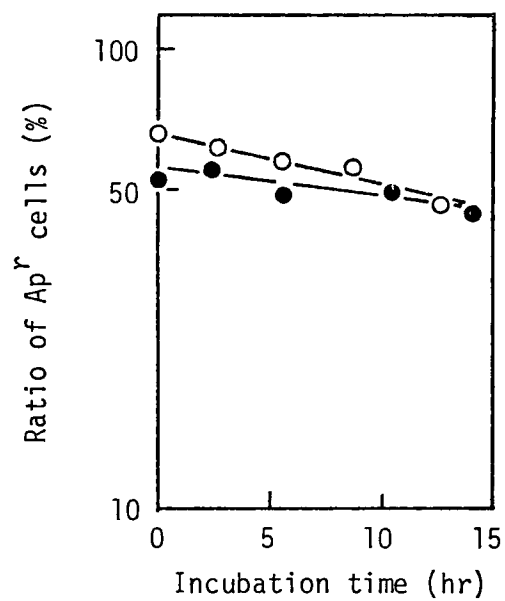


図14。シニF断片を持つ pBR322 由来プラスミド pXX 167 または pXX 300 共存下での oric プラスミド pXX 199 の安定性。

KY7231 株において, pXX 167 共存下 (●) または pXX 300 共存下 (○) での pXX 199 の安定性を「材料と方法」に従って調べた。

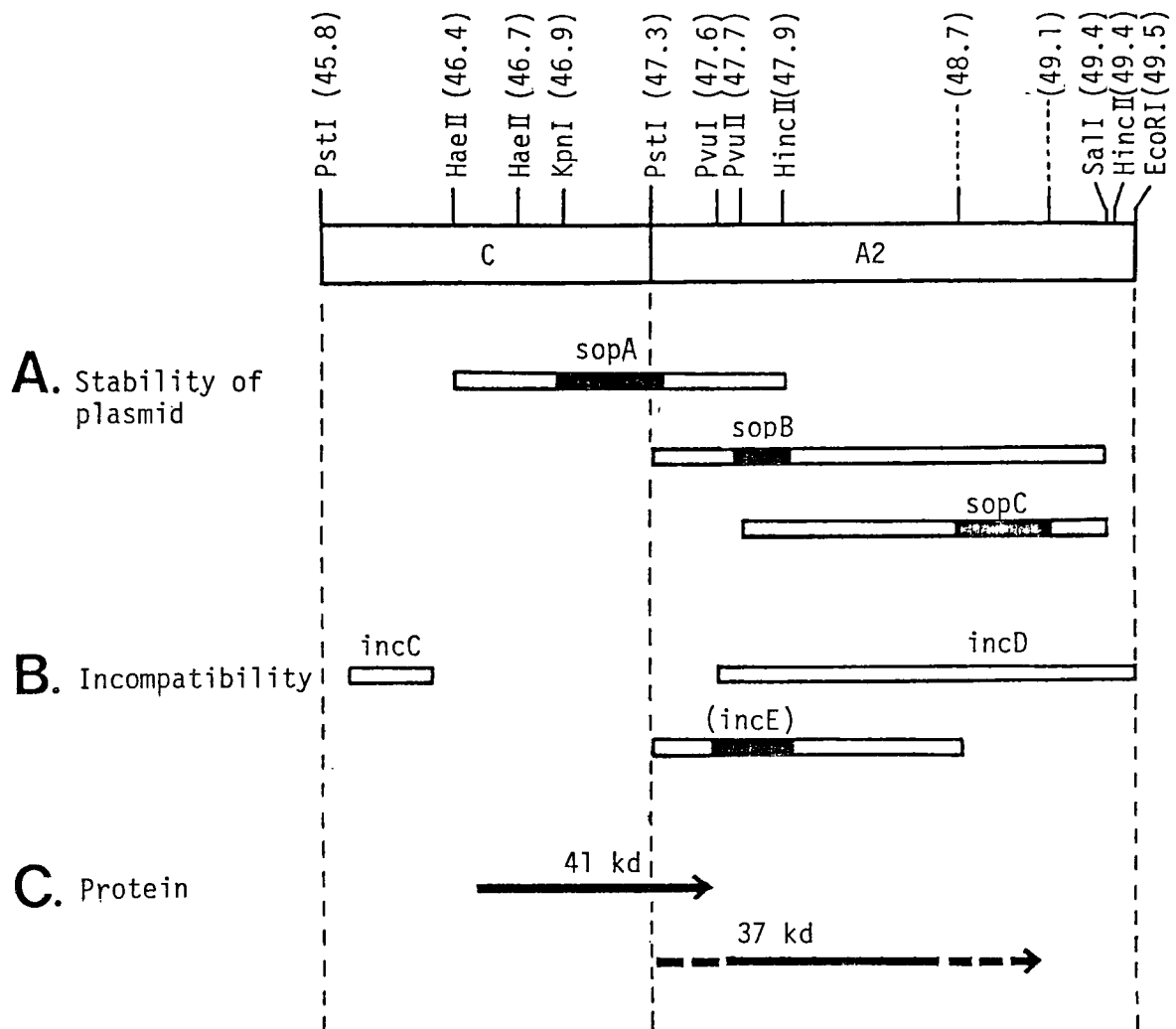


図15. C-A2断片の機能的地図。

この図はC-A₂断片の物理的地図を示す。カッコ内の数字はFゲル上のkb座標を表わす(3)。(A)プラスミドの安定保持に働く3つの*sop*遺伝子を示す。*sopA*、*sopB*および*sopC*の位置は図10、11および13に示した結果より推定した(本文参照)。(B)不和合性遺伝子を示す。*incC*の位置については報告されている(22, 23)。*incD*と*incE*の位置は後で述べる結果(本文および図18参照)より決定した。*incE*のカッコはこの不和合性が特別のプラスミドの存在下で観察されることを意味している(本文参照)。(C)コードされることがわかっているタンパク質を示す(80)。タンパク質をコードする領域と方向を矢印で示す。37kdタンパク質をコードする遺伝子の破線は遺伝子の可能な範囲を示す。

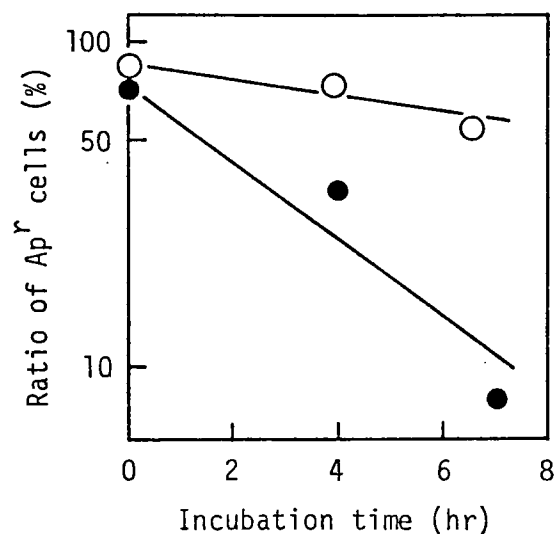


図16。pBR322由来プラスミドの安定性。

pBR322 または ミニFC-A2断片を結合した pBR322 由来プラスミド pXX167 を持つ MM383 (polA12) 株を 30℃ で 非選択培地を使って増殖させ、プラスミドの安定性を調べた。プラスミドの存在はテトラサイクリン耐性 (Tc^r) マーカーを使って調べた。●, pBR322 ○, pXX167。

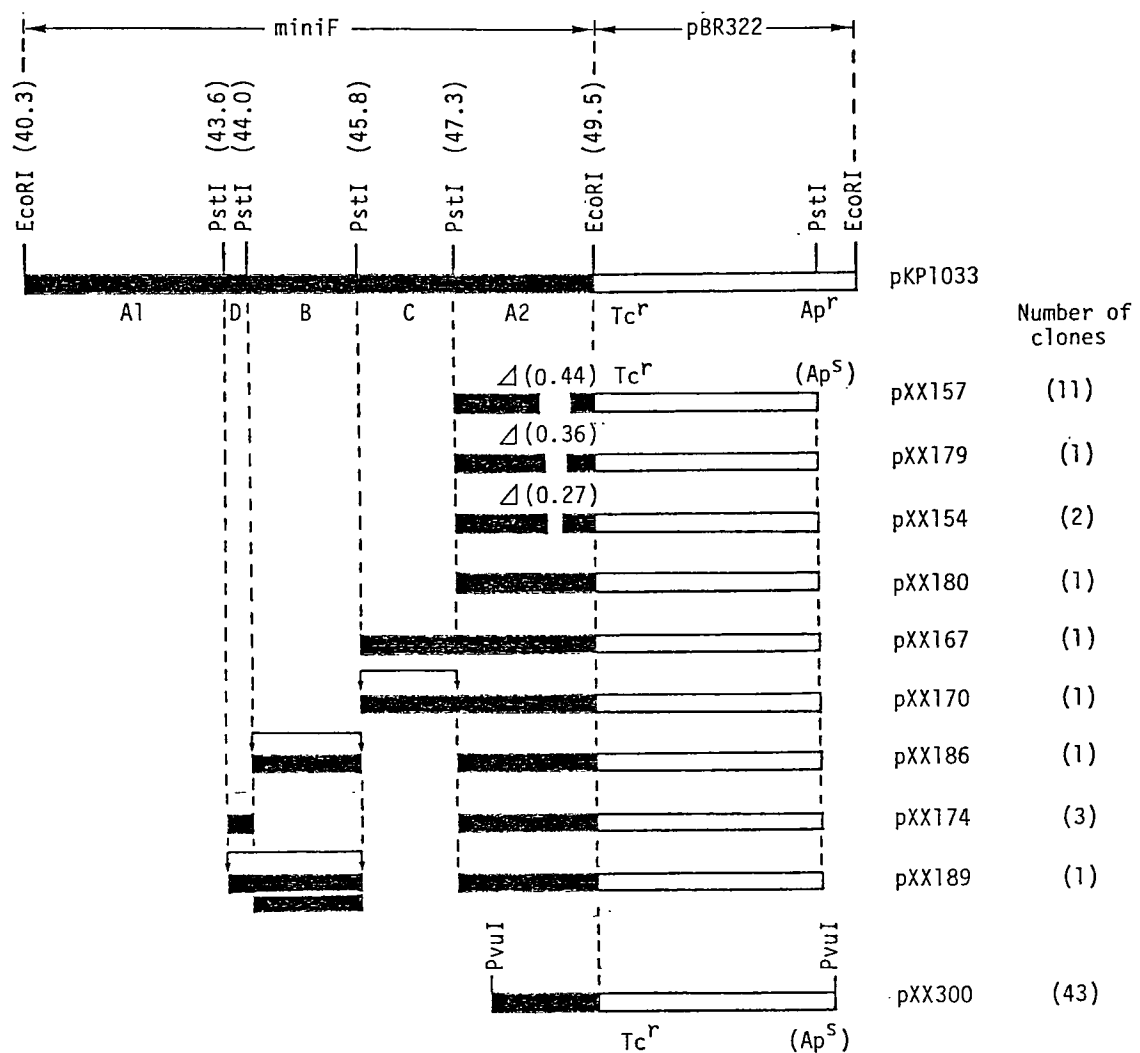


図17。pKP1033の欠失変異株の作製。

miniF-pBR322 重合プラスミド pKP1033 の欠失変異株を PstI または PvuI を使って作製した。黒帯は miniF 断片を表わし、白帯は pBR322 DNA を表わす。EcoRI と PstI の切断点を示す。pXX157, pXX179 および pXX154 の Δ は自然欠失変異を表わし、カッコ内の数字は欠失の大きさを kb 単位で表わす。↓ は断片の向きが pKP1033 での向きと逆であることを意味する。pXX189 では 2 つの B 断片が並んで結合している。独立に得られたクローンの数を右側にカッコに入れて示す。

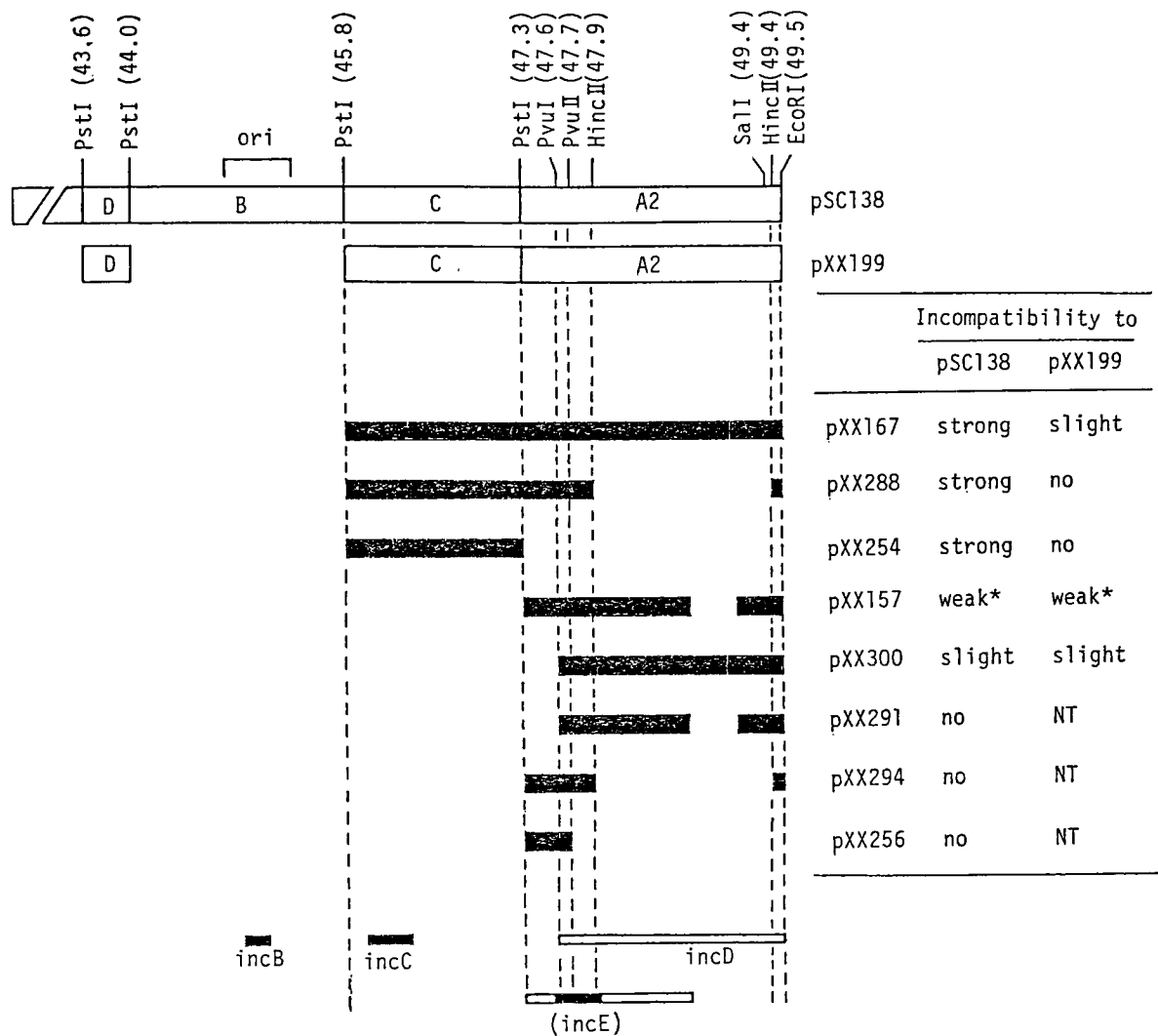


図18。C-A2断片内の不適合性領域。

ミニFプラスミド pSC138 または oriC プラスミド pXX199 に対する C-A2 断片を持つ pBR322 由来プラスミドの不適合性を“材料と方法”に述べた方法で調べた。pSC138 と pXX199 の持つミニF断片の物理的地図を上を示す。pBR322 由来プラスミド (pXX167 や pXX288 など) の持つミニF断片は黒帯で示す。pSC138 または pXX199 に対するこれらのプラスミドの不適合性の強さをそれぞれのプラスミドの右側に示す。テトラサイクリン耐性およびアンピシリン耐性マーカーに対して選択的条件下でも両プラスミドを同時に持つクローンを得ることができない場合の不適合性を“strong”と表示する。“Weak”または“slight”はそれぞれの pBR322 由来プラスミドが pSC138 または pXX199 の保持に対して弱い または わずかな阻害効果を示すことを意味する。“Weak”の星印は pXX157 が特別な性質を持つことを表わす (本文参照)。NT, 実験を行っていない。inc 遺伝子の位置は上に述べた実験から推定し、図の下に示した。incB と incC の正確な位置は報告されている結果による (22, 23)。pSC138 の地図の ori はミニFの複製起点を表わす。

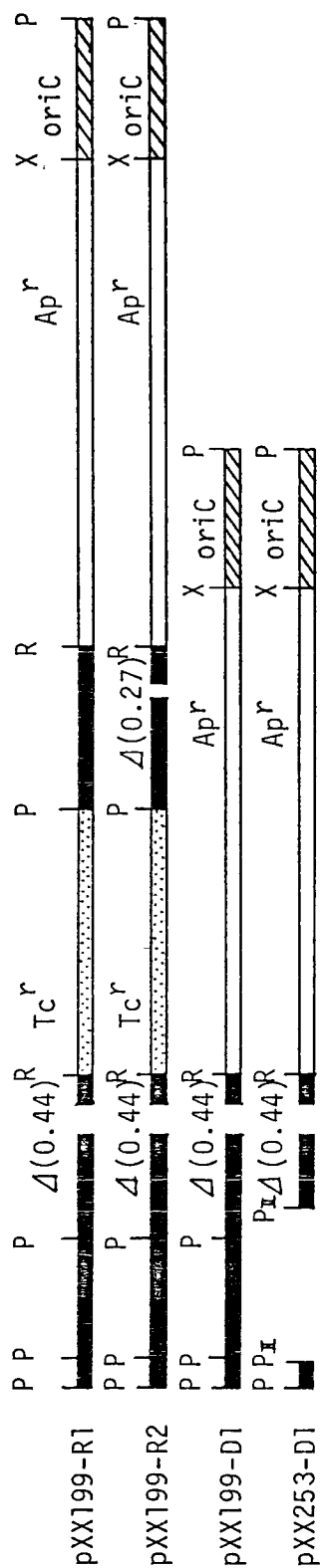


図19。oriCプラスミドとincEを持つpBR 322由来プラスミド共存下で得られた組換えプラスミドおよび欠失変異oriCプラスミドの構造。

pXX199-R1はpXX199とpXX157の共存によって、pXX199-R2はpXX199とpXX154の共存によって得られた組換えプラスミドである。pXX199-D1はpXX179共存下でpXX199に欠失変異が起ったものであり、pXX253-D1はpXX157共存下でpXX253に欠失変異が起ったものである。黒帯はミF DNA断片を、点帯はpBR 322のDNAを、斜線帯は大腸菌染色体由来の断片を、白帯はアンピシリン耐性断片をそれぞれ表わす。oriCは大腸菌染色体の複製起点をAp^rとTc^rはそれぞれアンピシリン耐性およびテトラサイクリン耐性遺伝子を表わす。制限酵素の切断点はP(PstI), R(EcoRI), X(XhoI)およびPⅡ(PvuII)である。Δは自然欠失変異を表わし、カッコの中の数字は欠失の大きさで表わす。

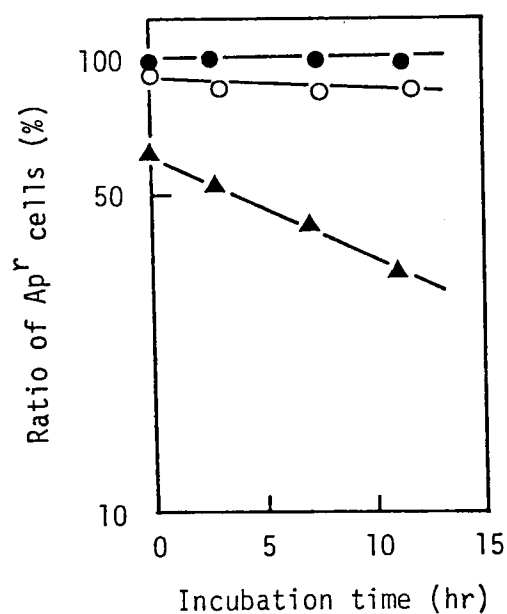


図20. oriC プラスミドの安定性。

oriC プラスミドを持つ K₂ 200 株を 非選択培地 (L 培地) で増殖させ、対数増殖期におけるプラスミドの安定性を「材料と方法」に述べた方法で調べた。それぞれのプラスミドを持つ株の増殖速度とプラスミドを持たない株の増殖速度との間には差は認められず、濁度で調べた世代時間はいずれも 44-47 分であった (データは示さず) ●, pXX299 ○, pXX199 ▲, pXX230。

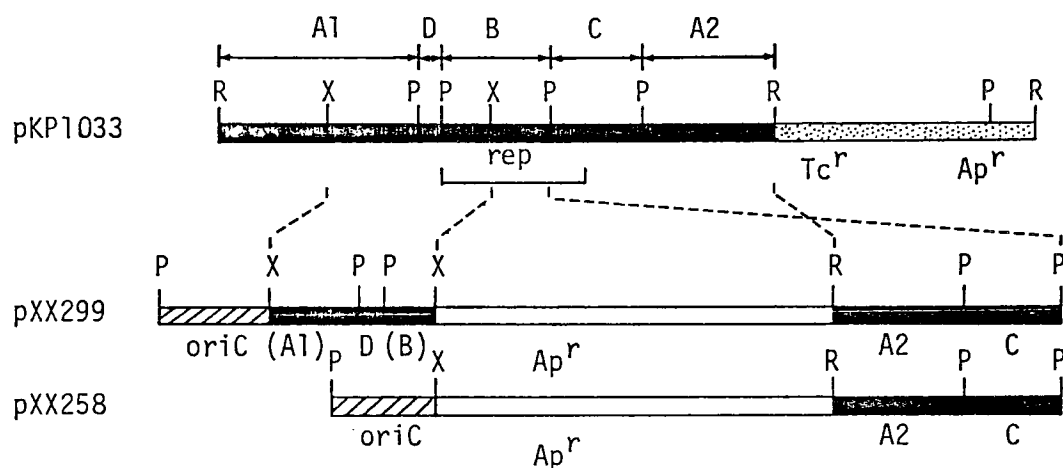


図21。 *oriC* プラスミドの構造。

DNA断片の名称(14)と制限酵素の切断点を示す。カッコ内に示した断片はその断片が部分的であることを表わす。*rep*は $\text{M}=\text{F}$ の複製に必須な最小領域(14)。*oriC*は大腸菌の複製起点。*Ap^r*と*Tc^r*はそれぞれアンピシリン耐性およびテトラサイクリン耐性遺伝子を表わす。黒帯は $\text{M}=\text{F}$ プラスミド由来のDNA, 点帯は pBR322 のDNA, 斜線帯は大腸菌染色体由来のDNA, そして白帯はアンピシリン耐性断片を表わす。

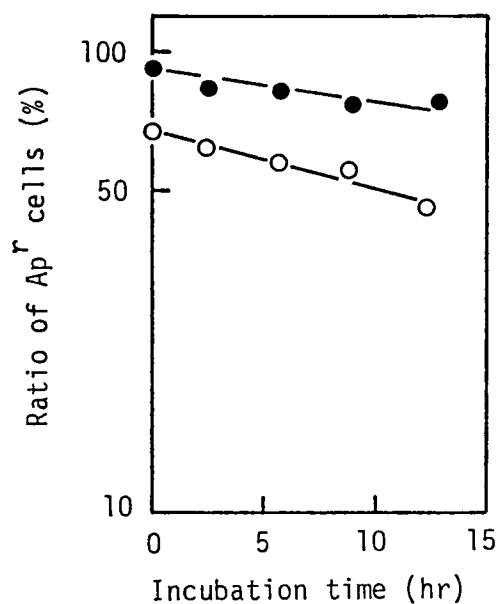


図22。 incDを持つpBR 322 由来プラスミド pXX 300 共存下での oriC プラスミドの安定性。

ミニFの incD領域(47.6-49.5 kb)を持つpBR322 由来プラスミド pXX-300 (図12)と oriC プラスミド pXX299 または pXX199 が共存する KY7231 株を使って“材料と方法”に述べた方法で非選択的条件下での oriC プラスミドの安定性を調べた。oriC プラスミドの存在はアンピシリン耐性(Ap^r)マーカを使って調べた。いずれの株においても pXX300の脱落は非選択的条件下でも検出されなかった(データは示さず)。●, pXX299 ○, pXX199。

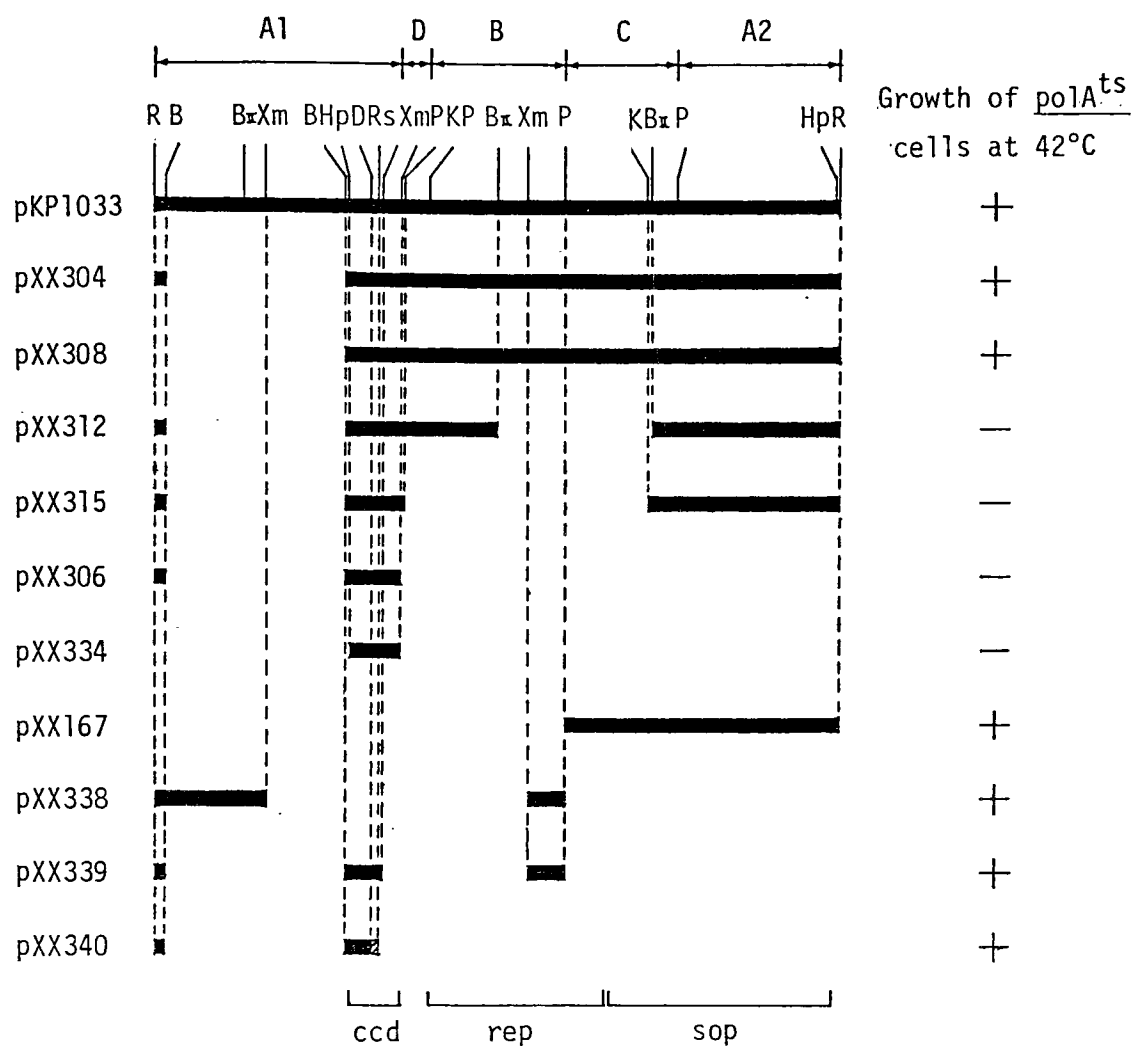


図23。種々の Mn^{2+} 断片を持つ pBR322 由来プラスミドの構造と性質。
 pKP 1033, pXX 304, pXX 312 および pXX 315 は pBR322 全ゲノムと図に示した Mn^{2+} 断片より成る。pXX 308 は pBR 322 の EcoRI-BamHI 断片と図に示した Mn^{2+} 断片より成る。pXX 306, pXX 344, pXX 167, pXX 338, pXX 339 および pXX 340 は pBR-322 の EcoRI-PstI 断片と図に示した Mn^{2+} 断片より成る。ただし pXX 340 の斜線帯は このプラスミドが 持つか否か 不明の領域を表わし, pBR 322 の PstI 切断点側には 欠失変異が起きている。それぞれのプラスミドを持つ *km* 1213 (*polA^{ts}*) 株の 42°C における増殖を右側に示す。制限酵素の切断点は R (EcoRI), B (BamHI), BII (BglII), P (PstI), K (KpnI), Xm (XmaI), Hp (HpaI), D (DdeI) および Rs (RsaI) である。ただし DdeI と RsaI の切断点は BamHI-PstI (42.85-43.6 kb) 領域内のみ示している。ccd は細胞分裂共役機構を司る領域を表わし この図に示した結果から決定した。rep は自律増殖に必須な最小領域 (14) を表わし, sop は分配機構を司る領域 (15) を表わす。

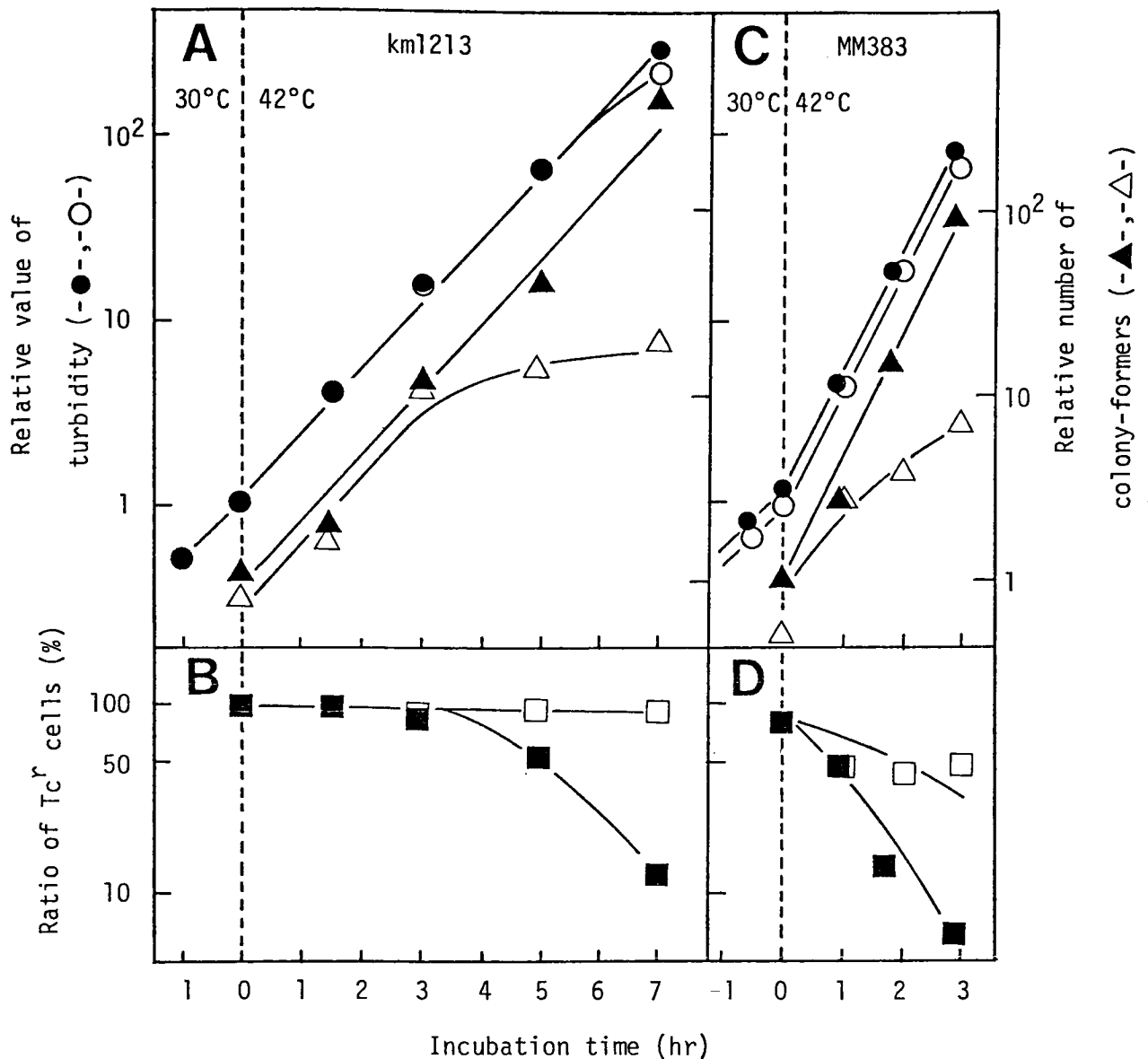


図24。42℃に移した後の細胞増殖とプラスミドの安定性の経時的変化。

pXX306 (図23) または pBR322 を持つ *km1213* (*polA^{ts}*) 株または *MM383* (*polA^R*) 株を非選択培地 (チミンを補った L 培地) で 30℃ において培養し、対数増殖期で 42℃ に移した。培養液は経時的に保温した新鮮な非選択培地で希釈し、常に対数増殖期に保った。A) プラスミドを持つ *km1213* の濁度と生菌数の増加。濁度はクレット=サマーン比色光電計で NO.54 フィルターを用いて測定した。生菌数は培養液を適当に希釈し、チミンを補った L 寒天培地に塗布して 30℃ で一夜培養後集落数を数えて調べた。B) プラスミドを持つ細胞の割合。プラスミドの存在はテトラサイクリン耐性 (Tc^r) マーカーで調べた。C) プラスミドを持つ *MM383* の濁度と生菌数の増加、および D) プラスミドを持つ細胞の割合はそれぞれ A) および B) と同様にして調べた。白抜き記号, pXX306 黒塗り記号, pBR322。

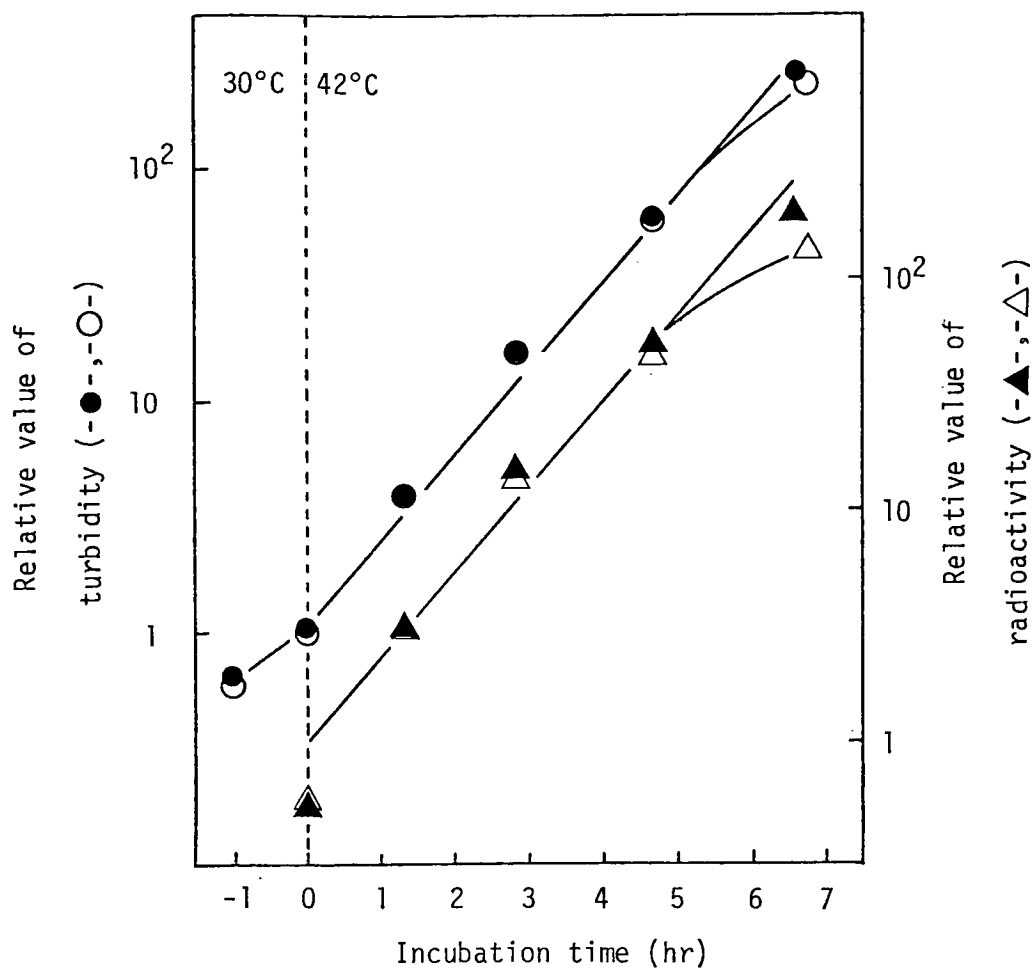


図 25。フラスコを持つ株の DNA 合成。

pXX306 または pBR322 を持つ km1213 株の 42℃ での DNA 合成を $[^{14}\text{C}]$ チミンの取り込みで調べた。培養液は経時的に保温した新鮮な $[^{14}\text{C}]$ チミンを含む L 地で希釈し常に対数増殖期に保った。白抜き記号, pXX306 黒塗り記号, pBR322。

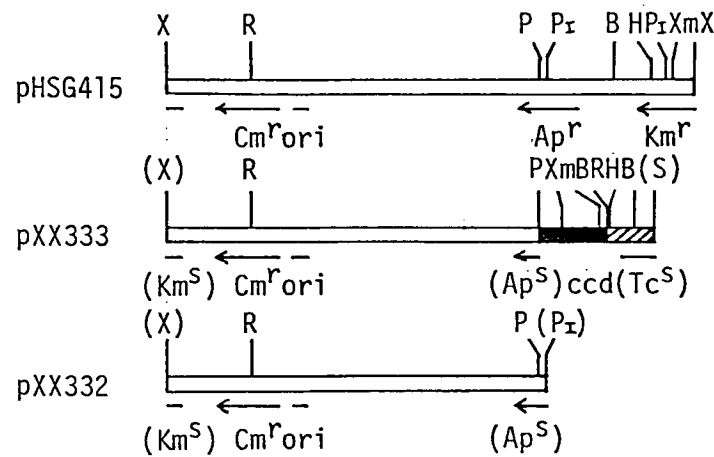


図26。ccd領域を持つ pSC101 由来プラスミドの作製。

複製能が温度感受性の pSC101 由来プラスミド pXSG415(67)に pXX-306(図23)の持つ ccd 領域を結合して pXX333を得た。また pXSG415の欠失変異株 pXX332を得た。白帯は pXSG415由来の DNA 断片を、黒帯はシニ F DNA断片を、斜線帯は pBR322の DNA断片を表わす。ori は pSC101 由来の複製起点領域を示す。Cm^r, Ap^rおよび Km^rはそれぞれクロラムフェニコール耐性遺伝子, アミノシリン耐性遺伝子およびカナマイシン耐性遺伝子を表わし、矢印は転写の向きと遺伝子の大きさを表わす。(Km^S), (Ap^S) および (Tc^S) はそれぞれカナマイシン耐性遺伝子, アミノシリン耐性遺伝子およびテトラサイクリン耐性遺伝子の一部だけを持つことを表わし、それぞれの薬剤に対して感受性であることを表わす。制限酵素の切断点は X(XhoI), R(EcoRI), P(PstI), Pi(PvuII), B(BamHI), H(HindIII), Xm(XmaI)および S(SalI)である。加この中に示した切断点は他の酵素の切断末端と結合したためその酵素によって切断されなくなったことを表わす。

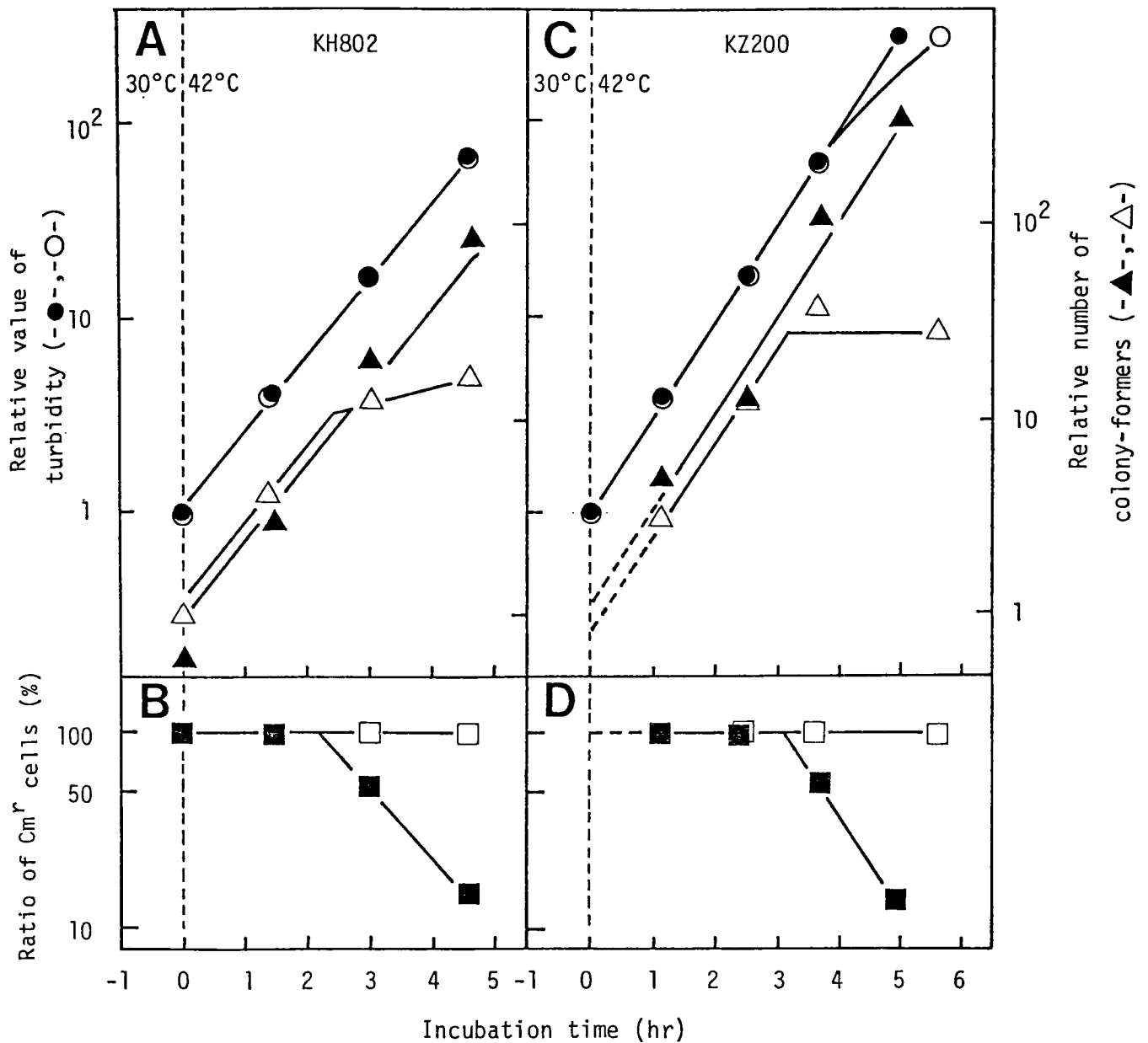


図27。プラスミドを持つ株の細胞増殖とプラスミドの安定性の経時的変化。
*ccd*領域を持つ pXX333 または *ccd*領域を持たない pXX332 (図26) の入った KH802 (*recA*⁺) 株の A) 濁度と生菌数の増加, B) プラスミドを持つ細胞の割合および これらのプラスミドを持つ KZ200 (*recA*⁺) 株の C) 濁度と生菌数の増加, D) プラスミドを持つ細胞の割合を図24の説明のようにして 42°C に移した後 経時的に調べた。プラスミドの存在はクロラムフェニコール耐性 (Cm^r) マーカーで調べた。白抜き記号, pXX333 黒塗り記号, pXX332。

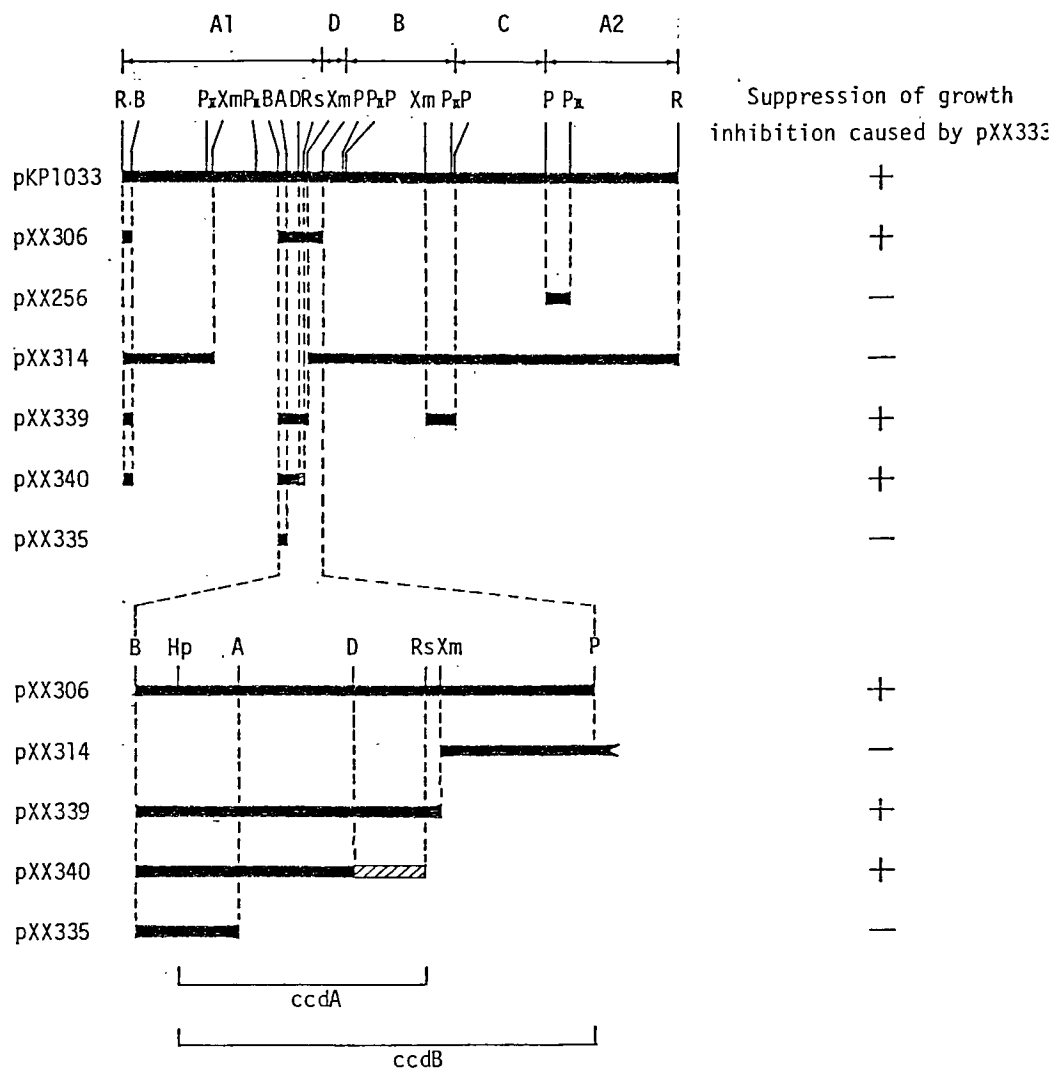


図28。種々のミ=F断片を持つ pBR 322 由来プラスミドの性質。

pKP 1033 と pXX 314 は pBR 322 全ゲノムと図に示した ミ=F 断片より成る。pXX 306, pXX 339 および pXX 340 は pBR 322 の EcoRI-PstI 断片と図に示した ミ=F 断片より成る。ただし pXX 340 の斜線帯は このプラスミドが持つか否か不明の領域を表わし、pBR 322 の PstI 切断点側には欠失変異が起こっている。pXX 256 は図に示した ミ=F 断片が pBR 322 の PstI 部位に挿入されている (図18 参照)。pXX 335 は pBR 322 の大きい方の BamHI-AccI 断片と図に示した ミ=F 断片より成る。pXX 333 (図26) を持つ KH 802 株を高温に移した時に起こる宿主菌の増殖阻害をこれらのプラスミドが抑制する効果を右側に示す。プラスミドの持つ A1 断片の BamHI-PstI (42.85-43.6 kb) 領域を10倍に拡大して下に示す。制限酵素の切断点は R(EcoRI) B(BamHI), P(PstI), PII(PvuII), Xm(XmaI) A(AccI), D(DdeI), Rs(RsaI) および Hp(HpaI) である。AccI, DdeI, RsaI, および HpaI の切断点は BamHI-PstI (42.85-43.6 kb) 領域内のみ示している。ccdA と ccdB は宿主菌の増殖阻害を抑制する遺伝子と増殖を阻害する遺伝子を示す (本文参照)。

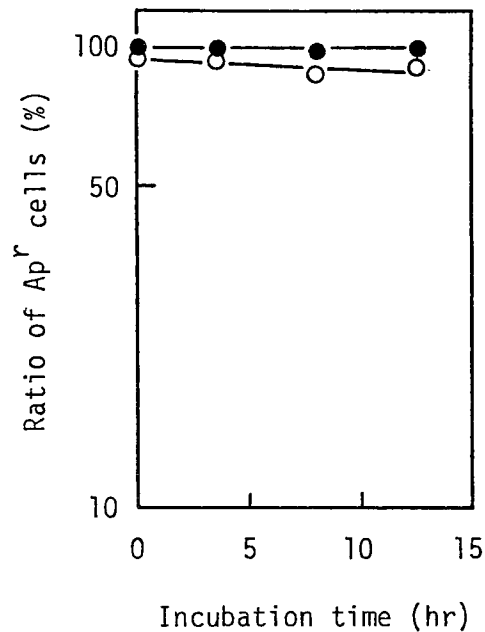


図29。シニF断片を持つpBR322由来プラスミド共存下での oriC プラスミド pXX 299の安定性。

ccd領域を持たないpBR322由来プラスミド pXX 256(図28)または ccd領域を持つpBR由来プラスミド pXX 306(図28)共存下での oriC プラスミド pXX 299の安定性をK2200株を使って“材料と方法”に述べたようにして非選択的条件下で調べた。oriC プラスミド pXX 299の存在はアンピシリン耐性(Ap^r)マーカーを使って調べた。いずれの株においてもpBR322由来プラスミドの脱落は検出されなかった(データは示さず)。●, pXX 256 共存下 ○, pXX 306 共存下。

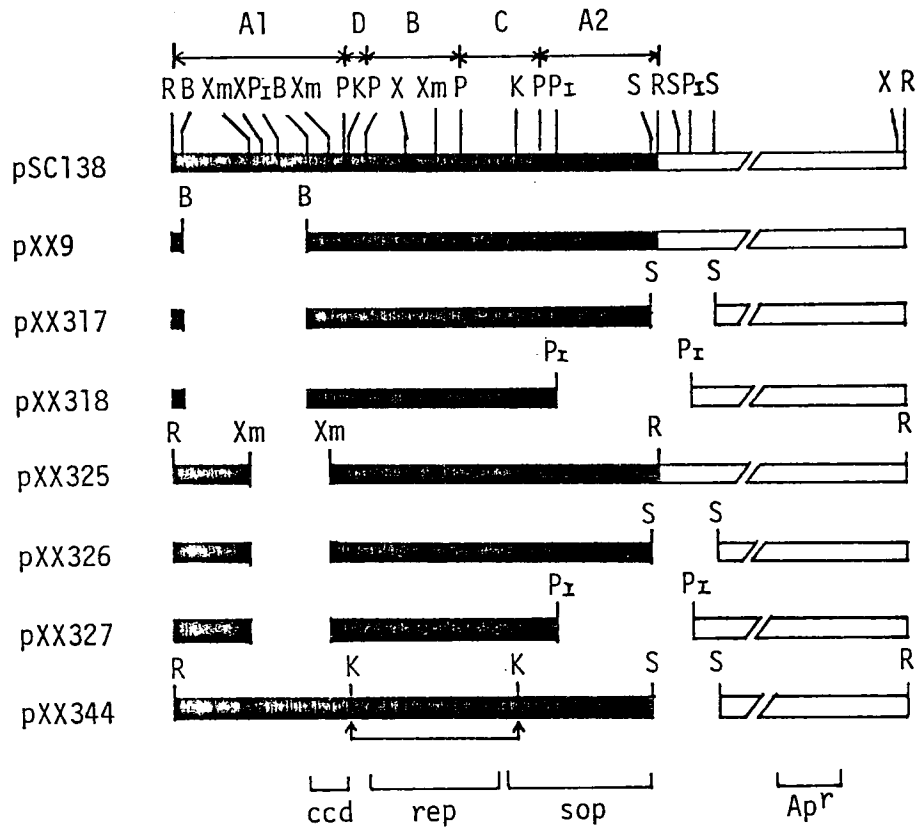


図30。ミニF欠失変異プラスミド。

欠失変異株を作製するために使った制限酵素の切断点のみ示した。黒帯と白帯はそれぞれミニF由来のDNAとアピシリン耐性断片を示す。↑は断片が逆向きに挿入されていることを示す。アピシリン耐性断片は一部省略して示す。

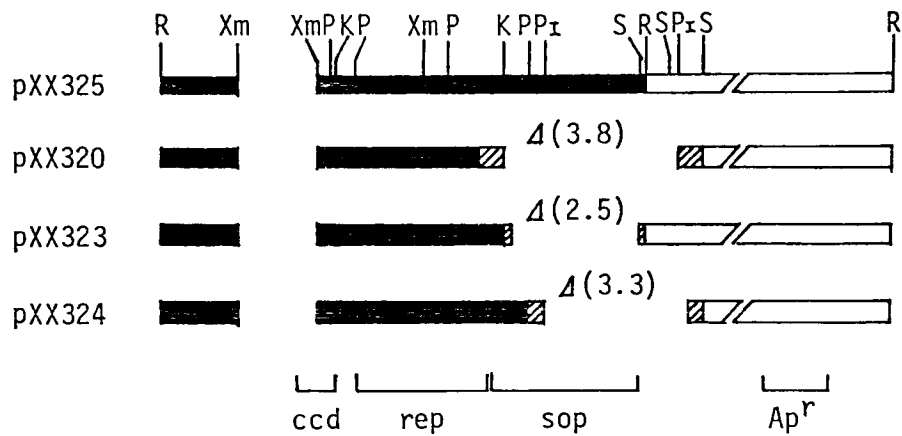


図31。自然欠失変異を持つミニFプラスミド。

pXX325(図30参照)を作製するとき自然欠失変異を持つミニFプラスミドが同時にいくつか分離された。黒帯と白帯はそれぞれミニF断片とアンピシリン耐性断片を表わす。斜線帯はプラスミドが持つか否か不明の領域を表わす。 Δ は自然欠失変異を表わし、カッコ内の数字は欠失の大きさをkbで表わす。アンピシリン耐性断片は一部省略して示す。

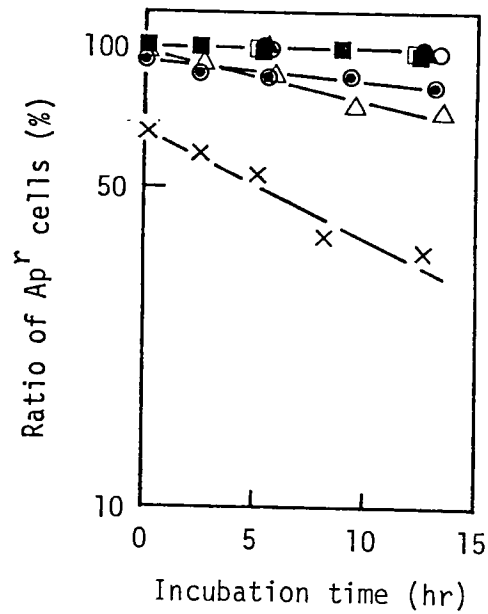


図 32。 λ F プラスミドの安定性。

λ F プラスミドを持つ KY 7231 株を非選択培地 (L 培地) で増殖させ、対数増殖期におけるプラスミドの安定性を「材料と方法」に述べた方法で調べた。●, pSC 138 ○, pXX 9 ▲, pXX 317 △, pXX 318 ■, pXX 325 □, pXX 326 x, pXX 327 ⊙, pXX 344。

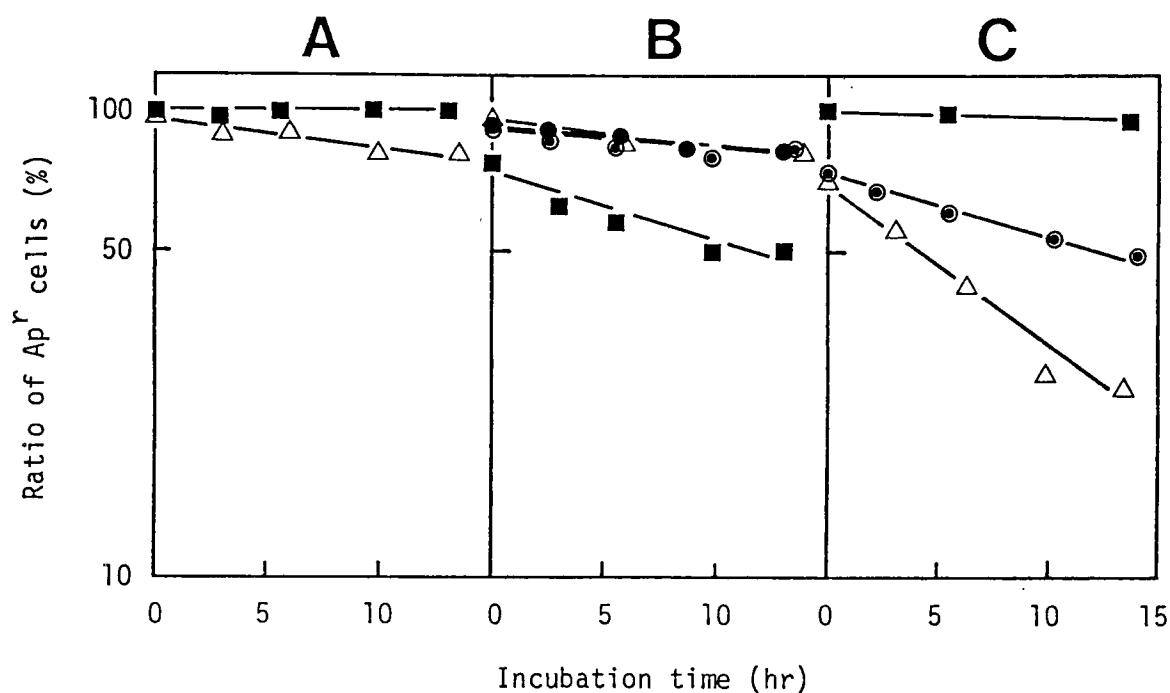


図33。ミニFプラスミドの種々の断片を持つ pBR322 由来プラスミド共存下でのミニFプラスミドの安定性。

pBR322 由来の pXX256 (A), pXX300 (B) または pXX306 (C) 共存下でのミニFプラスミドの安定性を KY7231 株を使って調べた。ミニFプラスミドの存在はアンピシリン耐性 (Ap^r) マーカーを使って調べた。

●, pSC138 Δ, pXX318 ■, pXX325 ⊙, pXX344。

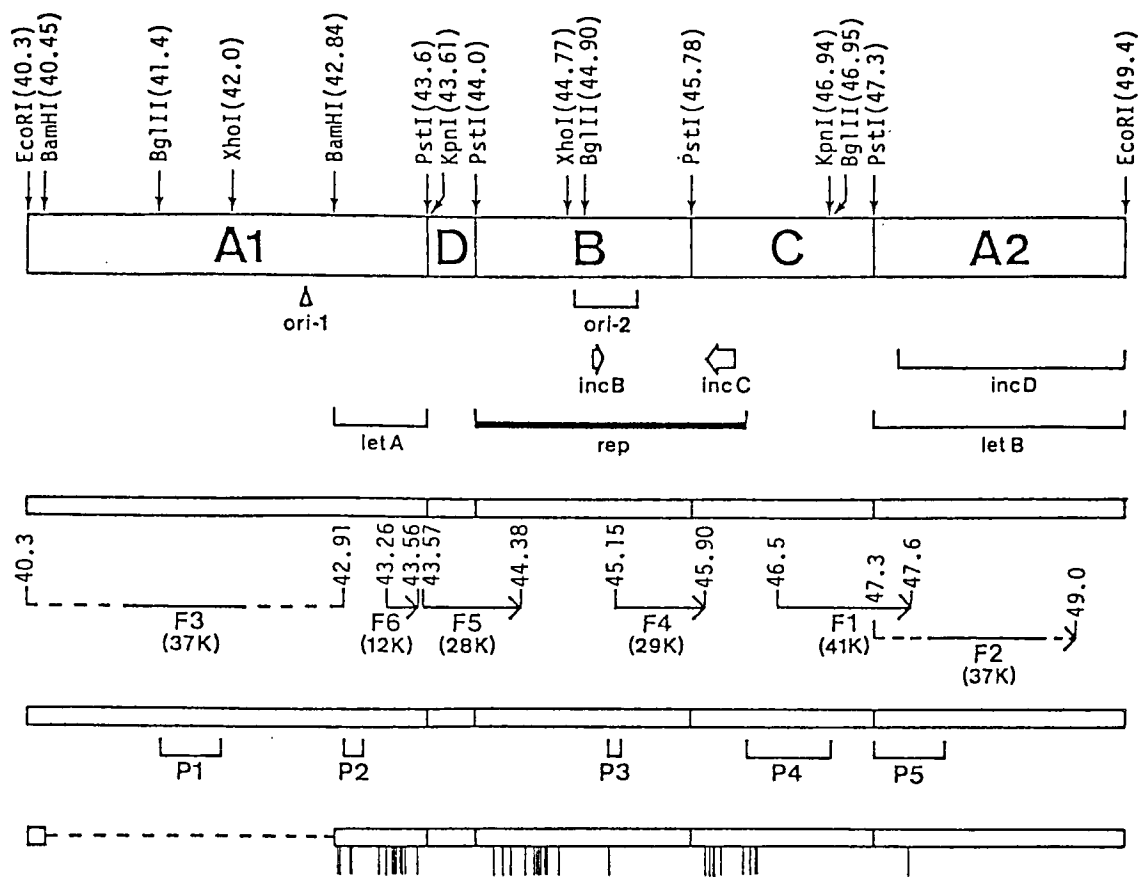


図34。ミニFにコードされるタンパク質 (文献80より転載)。

a. ミニFの物理的、機能的地図。ゲルの条件の違いにより物理的地図の位置が私の結果(図4と9)とは少し異なる点に注意。ori-1とori-2は電顕で観察された複製起点である(85,86)。-対の逆向きの矢印は4または5個の単位から成る2つの直列くり返し構造を表わし、これらのくり返し構造はそれぞれ IncBとIncCの表現型を決定している(22,23)。repは自律増殖できる最小領域である(14)。letAとletBはその遺伝子に変異が走ったプラスミドを持つ細胞が増殖できない遺伝子として同定された(55,58)。b ミニFがコードするタンパク質の遺伝子領域と転写の向き。矢印は推定される転写の向きと遺伝子の大きさを表わす。F2とF3の正確な遺伝子領域はまだ決定されておらず、これらの遺伝子については実線が期待される大きさを表わし、破線は可能な範囲を表わす。c RNAポリメラーゼ結合部位。RNAポリメラーゼが結合する5つの領域を示す(87)。d Tn3挿入部位(19)。この研究に用いたプラスミドは BamHI断片(破線部分)が欠失したミニF-Kmプラスミドである。これらの挿入によって複製能が損われることはなく、またこれらの挿入は少し補正すればbに示したタンパク質をコードする領域の間隙領域に走っていると考えられる点に注意。

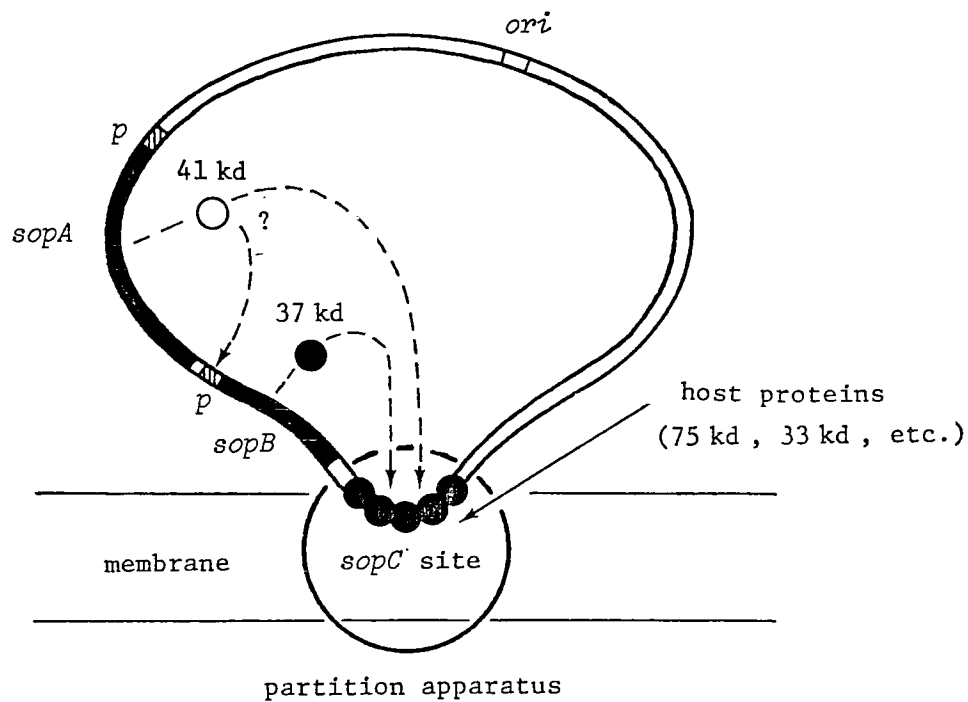


図35。Fプラスミドの分配装置のモデル。

sopA と *sopB* 遺伝子は黒帯で表わし、これらの遺伝子のプロモーター(*p*)は斜線帯で表わす。*ori* はプラスミドの複製起点を表わす。詳細は本文参照。

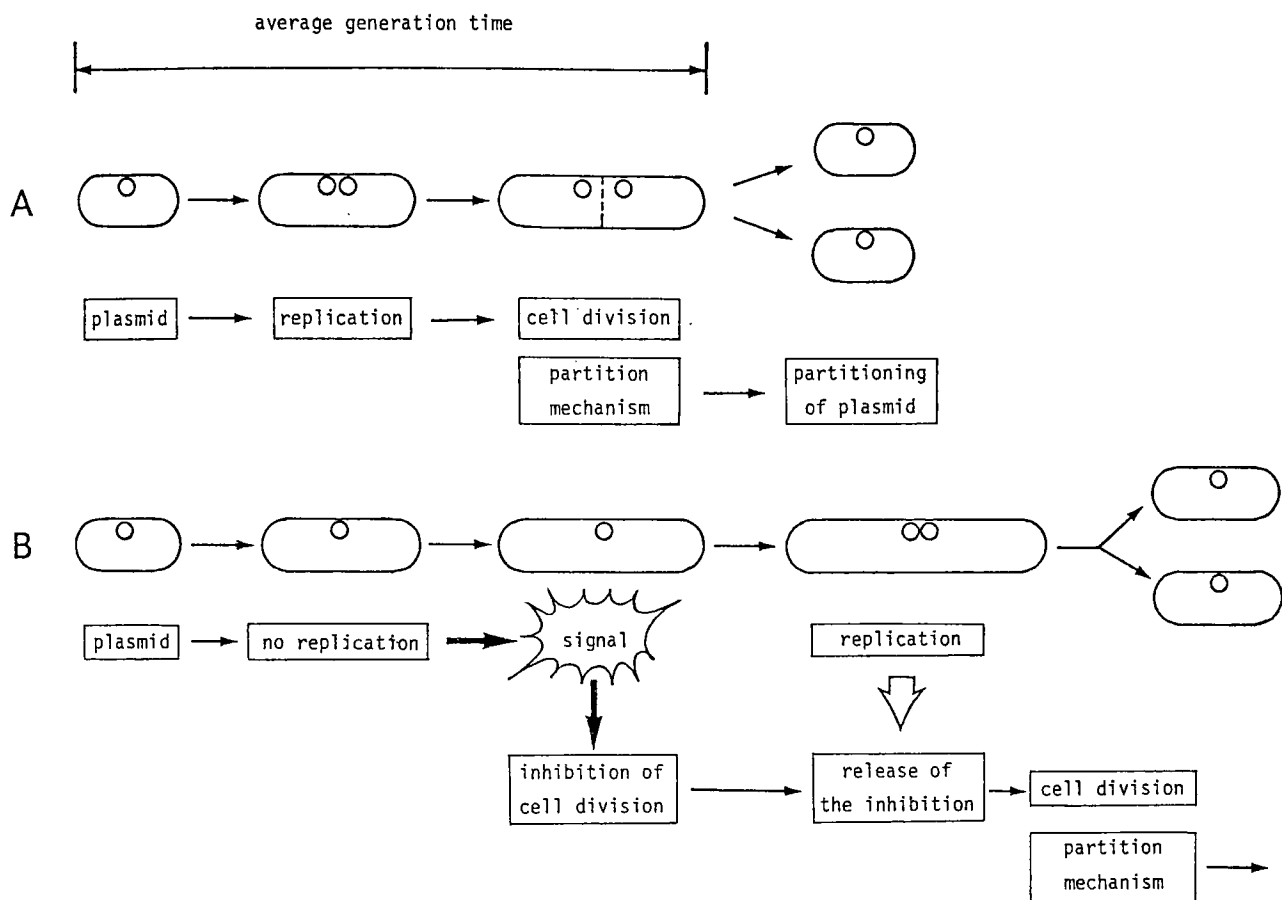


図36。 プラスミドの複製と宿主細胞分裂の共役。

ccd 領域を持つプラスミドの存在が宿主細胞分裂に及ぼす作用を模式的に示す。細胞内の小さい丸はプラスミド分子を表わす。A) 通常の場合のプラスミドの複製と宿主細胞の分裂を表わす。B) ccd 領域を持つプラスミドが平均世代時間内に複製しなかった場合の様子を表わす。プラスミドが複製しないで細胞内に1コピーしか存在しない時にはそのことを ccdA が感知し、ccdB の働きによって(シグナル)、宿主の細胞分裂が阻害される。その後プラスミドが複製すれば ccdA によって ccdB の働きが抑制され細胞分裂が起こる。詳細は本文参照。